

高速気体を利用した薬物含有微粒子の

皮膚内送達に関する研究



甲第20号

内田 昌希

高速気体を利用した薬物含有微粒子の
皮膚内送達に関する研究

内田 昌希

目 次

総論の部	1
緒言	1
第 1 編 Particle bombardment system を用いた薬物含有微粒子の皮膚内導入に関する検討	
第 1 章 Helios™ gun system を用いた薬物含有微粒子の皮膚内導入法の確立	5
第 1 節 Helios™ gun system を用いた薬物含有微粒子の皮膚内導入法	5
第 2 節 組織学的検討	9
第 3 節 本章の考察	10
第 2 章 薬物含有微粒子の皮膚内導入に関する検討	12
第 1 節 IDM 含有 PLAMS の調製及び特性	12
第 2 節 IDM 皮膚内導入率に対するヘリウム圧及び粒子径の影響	14
第 3 節 皮膚障害性に対するヘリウム圧及び粒子径の影響	16
第 4 節 IDM 皮膚内導入率及び皮膚障害性に対する投与量の影響	19
第 5 節 IDM 皮膚内導入率及び皮膚障害性に対する複数回投与の影響	23
第 6 節 本章の考察	25
第 3 章 Particle bombardment system による IDM の全身送達に関する検討	26
第 1 節 IDM 血中濃度推移に対するヘリウム圧及び粒子径の影響	26
第 2 節 IDM 血中濃度推移に対する投与量の影響	30

第3節	IDM 血中濃度推移に対する複数回投与の影響	32
第4節	本章の考察	34

第4章	粒子画像流速測定法 (PIV) による IDM 含有 PLA MS 皮膚内導入の解析	35
第1節	PIV の原理	35
第2節	Helios™ gun system から噴射される粒子群の軌道に関する解析	37
第1項	Helios™ gun system から噴射される粒子軌道の観察	37
第2項	Helios™ gun system から噴射される粒子軌道のベクトル解析	39
第3節	薬物含有微粒子の皮膚内導入に関与する因子の解析	41
第1項	粒子速度に対するヘリウム圧の影響	41
第2項	粒子速度に対する微粒子の粒子径の影響	43
第3項	粒子速度に対する微粒子の投与量の影響	44
第4項	皮膚内導入率及び吸収率に対する粒子速度並びに PLA MS の相対質量の影響	45
第4節	本章の考察	47

第2編 Particle bombardment system を用いた抗原含有微粒子の免疫処置に関する検討

第1章	OVA 含有 PLG MS の皮膚内導入に関する検討	50
第1節	OVA 含有 PLG MS の調製及び特性	50
第2節	組織学的検討	52
第3節	皮膚内導入率に関する検討	53
第4節	本章の考察	54

第2章 Particle bombardment system を用いた免疫処置に関する検討	55
第1節 Particle bombardment system を用いた免疫処置による 抗体応答	55
第2節 Particle bombardment system を用いた免疫処置による 免疫応答性	58
第3節 本章の考察	65
結論	67
謝辞	71
実験の部	72
第1編	
第1章 実験の部	72
第2章 実験の部	74
第3章 実験の部	78
第4章 実験の部	80
第2編	
第1章 実験の部	82
第2章 実験の部	85
引用文献	89

総論の部

総論の部

緒言

薬物を皮膚から投与する Transdermal Drug Delivery System (TDDS) もしくは Transdermal Therapeutic System (TTS) は、薬物の肝臓での初回通過代謝の回避、一回の投与で長時間にわたる薬物血中濃度の維持、投与の簡便さなどの利点を有し、患者の QOL の向上ばかりでなく、高齢化社会においても極めて有用であると思われる。しかしながら、外因物質やウイルス等の浸透や侵入、さらには体液の蒸散に対するバリアー機能を有する皮膚（特に、脂質に富んだ角質層）は、薬物の吸収に対してもバリアーとして働くため、ほとんどの薬物の吸収性は著しく低い。よって、TDDS として製剤化された薬物は、ニトログリセリンや硝酸イソソルビドなど十種類程度の薬物しかない現状にある。薬物の経皮吸収速度は、薬物の脂溶性、分子量及び溶解度といった物理化学的性質によって決定される。ほとんどの薬物の製剤化を断念せざるを得ないのは、薬理効果を得るのに十分な吸収速度を得るためのこれら物性の条件が満たされないためである。それゆえ、当研究室を含む多数の研究グループが今日までに有用性の高い TDDS を開発するために、皮膚吸収性に関わる基本的な研究を積み重ねる一方で、皮膚吸収性の低い薬物の吸収を改善するために、製剤中に適切な吸収促進剤を含有させ吸収を促進させる化学的促進法¹⁻³⁾や、電気的駆動力を利用してイオン性の薬物の吸収を電流または電圧により制御するイオントフォレーシス⁴⁻⁶⁾、超音波の周波数や照射時間で薬物透過を制御するフォノフォレーシス⁷⁻⁹⁾などの物理的促進方法を検討してきた。しかし、多くの薬物、特に水溶性で高分子量のペプチドやたんぱく性医薬品では、これらの方法を用いても有用性の高い改善に至った例はほとんどない。

このような背景から、当研究室では角質層が薬物吸収に対するバリアーとはならず、皮膚内に薬物を送達できる方法について検討してきた。その一つとして無針注射器（商品名、プレシジェット）を利用して、角質層の一部

に細孔を形成し、その細孔から薬物の経皮吸収を増加させる研究を行ってきた¹⁰⁾。この研究は、水圧により皮膚に細孔を形成させるもので本研究の基盤となったものである。プレシジェットにより皮膚に細孔を形成させると、細孔の大きさや数によって薬物の透過速度が著しく改善された。しかも、この透過速度は、どの薬物においても用いた溶媒の移行クリアランスに等しく一定であった¹¹⁾。このように低分子薬物や水溶性、イオン性の薬物には極めて有用であることが明らかとなってきた。しかし、高分子量のペプチド医薬品への応用を試みたところ、分子量に依存した吸収速度の低下と低分子薬物ではみられなかった吸収速度のばらつきが認められた¹⁰⁾。さらにこの方法は角質層の部分的な破壊を伴い、安全面での検討も十分必要と考えられた。

そこで著者は、様々な物理化学的性質を有する薬物、特に水溶性高分子薬物を固体微粒子（粉末粒子）として直接皮膚内に導入できると考えられる particle bombardment system に着目した。このシステムは元々 particle gun 法もしくは gene gun 法と呼ばれ、近年著しい発展がみられる遺伝子導入法の一つである。DNA または RNA をコーティングした金またはタングステン粒子（粒子径 1-3 μm ）をヘリウム圧や電圧等を利用して高速に加速させ、in vitro 及び in vivo において物理的に植物または動物細胞内に DNA または RNA を導入する方法¹²⁻¹⁴⁾で、in vitro での導入効率は従来までのリン酸カルシウム法¹⁵⁾や DEAE デキストラン法¹⁶⁾、リポソームを応用したりポフェクチン法^{17, 18)}及び瞬間的もしくはパルス状に高い電圧を適用し皮膚に可逆的な小孔を形成させ遺伝子を導入する electroporation 法^{19, 20)}の数十～数百倍で^{21, 22)}、種々の遺伝子の導入²³⁻²⁷⁾や DNA ワクチン²⁸⁻³²⁾等の研究において利用されている。この遺伝子導入法の原理を、粉末薬物粒子の皮膚内送達に応用できれば、皮膚角質層がバリアーとしての役割を果たさないので、薬物の物理化学的性質とは無関係に様々な薬物の送達が可能になると考えられる。さらに、薬物の水溶液中での安定性の問題がないことや mm オーダーでの角質層の破壊を生じないことから極めて有用であると思われる。また、これまで注射以外の剤形でほとんど成功例のない、極微量で効果が得られる水溶性高分子のペプチドや蛋白性医薬品、さらにはワクチンを用いた注射以外の治療を現実のものとする

る可能性を秘めている。特にワクチン接種においては生体防御反応が少量の抗原投与で成立し、抗原を封入した微粒子を投与することで抗原水溶液を投与したときよりも有意に高い免疫応答が誘導できる、すなわち、微粒子とすることでアジュバント効果が得られることが報告されている³³⁻³⁸⁾。さらに、皮膚には免疫反応を開始するのに必要不可欠な抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞（一般に表皮に存在）をはじめとする樹状細胞（一部真皮にも存在）が存在し³⁹⁻⁴¹⁾、このシステムでの投与法は投与部位である皮膚が免疫学的に活発な組織になると考えられた^{42,43)}。

近年、この考え方に基づいた *transdermal powdered drug delivery* に関する研究が報告された⁴⁴⁾。特に装置に関して、既に英国において、PowderJect Pharmaceuticals plc. (Oxford, UK)から Dermal PowderJect^{®45)}が市販の運びとなっている。皮膚透過性が良好でない医薬品を固体粉末のまま皮内もしくは皮下に送達し、さらに全身へ分布させることを目的として、現在では流体力学的な観点から拳銃の原理を応用して最適な噴射部位の構造を模索したり、消音性を機械工学的に検討している⁴⁴⁾。しかし、粉末薬物を直接皮膚内に導入できることは報告されているものの⁴⁵⁾、薬物送達システムの最大のポイントである医薬品の定量的な導入、放出制御及び基礎的な条件設定（例えば、投与量、噴射圧等）に関しては、ほとんど検討されておらず、実用化に向けては多くの投与条件に関しての正確な評価が必要な初期段階にある。

そこで、本研究において、遺伝子銃である Helios™ gene gun system を用いて、粉末薬物粒子を直接皮膚内に効率良く送達できる条件を設定し、応用性を調べ *particle bombardment system* としての有用性を検討した。第1編-第1章ではまず遺伝子銃である Helios™ gene gun system のカートリッジに工夫を施し、粒子径数十 μm の微粒子を簡便かつ定量的に投与できるようにシステム (Helios™ gun system) を構築した。第1編-第2章ではモデル薬物にインドメタシン (IDM) を選択し、IDM 含有ポリ乳酸マイクロスフィア (PLA MS) を導入用粒子として調製し、Helios™ gun system を用いて IDM 含有 PLA MS を効率良く皮膚内に導入するための条件を設定するために、皮膚内導入率に対するヘリウム圧、粒子径及び投与量の影響について検討した。第1編-第

3章では、第1編－第2章の結果に基づいて、Helios™ gun system を用いて IDM 含有 PLA MS を皮膚内に導入した後の IDM 全身送達性に対するヘリウム圧、粒子径及び投与量の影響について検討した。第1編－第4章では、粒子画像流速測定法（PIV）⁴⁶⁾ を用いて、Helios™ gun system から噴射される粒子の速度を測定し、皮膚内への導入効率及びバイオアベイラビリティを決定している因子について解析した。第2編では、第1編の結果に基づいて、この新規投与方法が最も有用であると思われる免疫処置への応用をモデル抗原に ovalbumin (OVA) を選択し、OVA 含有ポリ乳酸グリコール酸共重合体マイクロスフィア（PLG MS）を調製して試みた。

第 1 編 Particle bombardment system を用いた薬物含有微粒子の皮膚内導入に関する検討

第 1 章 Helios™ gun system を用いた薬物含有微粒子の皮膚内導入法の確立

遺伝子導入法である particle bombardment system を応用した粉末薬物粒子の皮膚内送達に関する研究はここ数年で始まったばかりであるが、送達する装置については既に英国の研究グループ (PowderJect Pharmaceuticals plc.) により hand-held 式の装置 Dermal PowderJect® が開発されている^{44, 45)}。彼らは、この Dermal PowderJect® を用いるとヘリウム圧により薬物粒子が 500-750 m/s にまで加速され、皮膚の角質層を通過して表皮-真皮間に送達でき、また、皮膚内への導入が瞬間的であるため、ヒトにおいてほとんど痛みがないと報告している^{44, 47)}。一方、日本ではこの分野に関する研究は未だ行われていないのが現状である。そこで著者は本章で、既に市販されている遺伝子銃の Helios™ gene gun system (Helios™ gun system) のカートリッジに工夫を施し、粒子径数十 μm の微粒子を簡便かつ定量的に投与できるようにシステムを構築し、このシステムを用いて粒子径数十 μm の微粒子の皮膚内送達に関して検討した。

第 1 節 Helios™ gun system を用いた薬物含有微粒子の皮膚内導入法

Helios™ gun system は Fig. 1 に示すように本来、遺伝子導入装置であり、DNA や RNA 等をコーティングした粒子径 1-3 μm の金及びタングステン粒子 (比重約 19 g/cm^3) をヘリウム圧で高速に加速させ、植物及び動物細胞内に物理的に直接導入させることができ、in vitro のみならず in vivo でも導入可能である。この方法を用いた癌などの遺伝子治療²³⁻²⁷⁾ または DNA ワクチン²⁸⁻³²⁾ に関する報告が多数あり、今後の広い応用が期待されている。

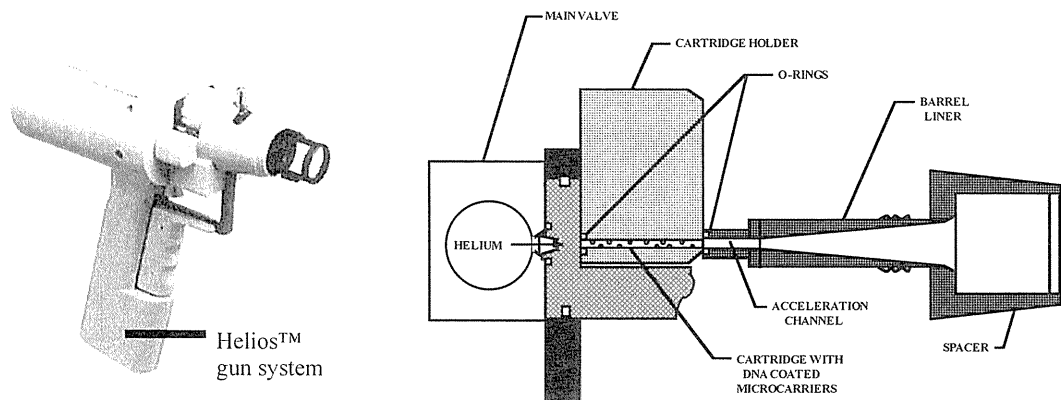


Fig. 1 Schematic of the Helios™ gun system

しかしながら、Helios™ gun system を通常の遺伝子導入に用いる場合、遺伝子をコーティングした粒子径 1-3 μm の金粒子をカートリッジであるチューブの内壁にコーティングさせる方法をとるために、これを粉末薬物の皮膚内導入に応用するには以下のような問題を生じた。

- 1) 金粒子は体内から消失されずに蓄積するので、慢性疾患用薬等の頻回投与には使用できない。
- 2) 金粒子の比重が導入に深く関与しているため、媒体には比重が大きいものを選択しなければならない。
- 3) 簡便性及び投与量を定量的にコントロールするために、カートリッジに工夫を施すことが必要である。

そこで、生分解性の高分子物質を用いて調製した微粒子を担体として代替した。しかし、生分解性高分子物質の比重はいずれも約 1 であるため、粒子の比重を大きくする代わりに粒子質量を大きくする、つまり粒子径を大きくすることで比重を補えると考えられた。次にこれらの微粒子を充填・保持し投与量を定量的にコントロールするために、カートリッジチューブに工夫を施した。つまり Fig. 2 のように、二つに分離したステンレス製チューブ（長

さ 15 mm、内径 2 mm) とリング (長さ 0.5 mm、外径 3 mm、内径 2 mm) の間に破裂膜としてポリ塩化ビニルフィルム (厚さ 10 μm) を挟み、ステンレス製チューブの底に破裂膜を装着したカートリッジコンテナを作製した⁴⁸⁾。この中に既知量の微粒子を充填し、これをカートリッジホルダーに納めた。次に、これを Helios™ gun system にセットし、微粒子を各ヘリウム圧で高速に加速させ皮膚内に導入した (Fig. 3)。この方法により上記のような問題点を解決した。なお、本研究での Helios™ gun system の操作条件を Table 1 のように設定した。

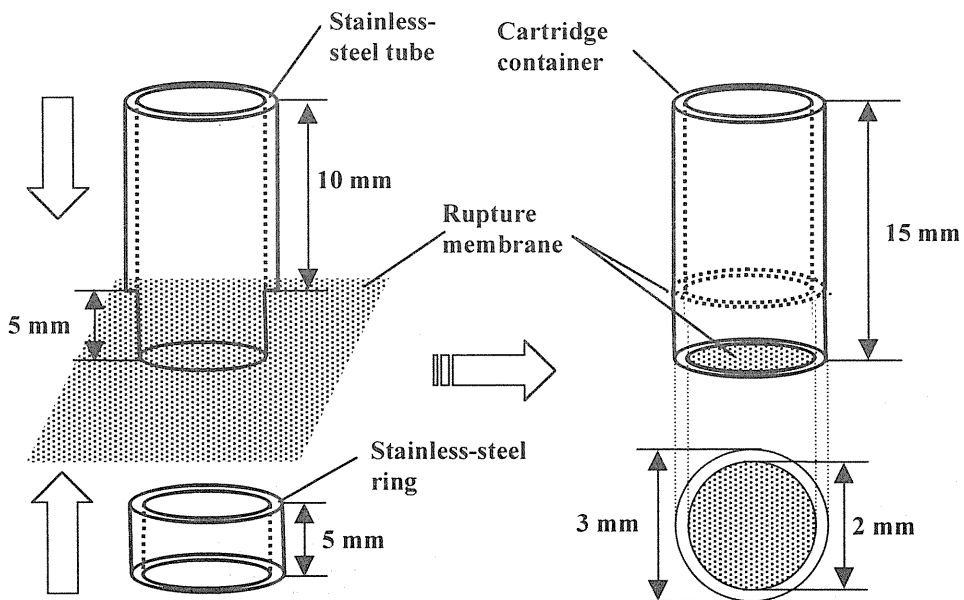


Fig. 2 Assembly of cartridge container

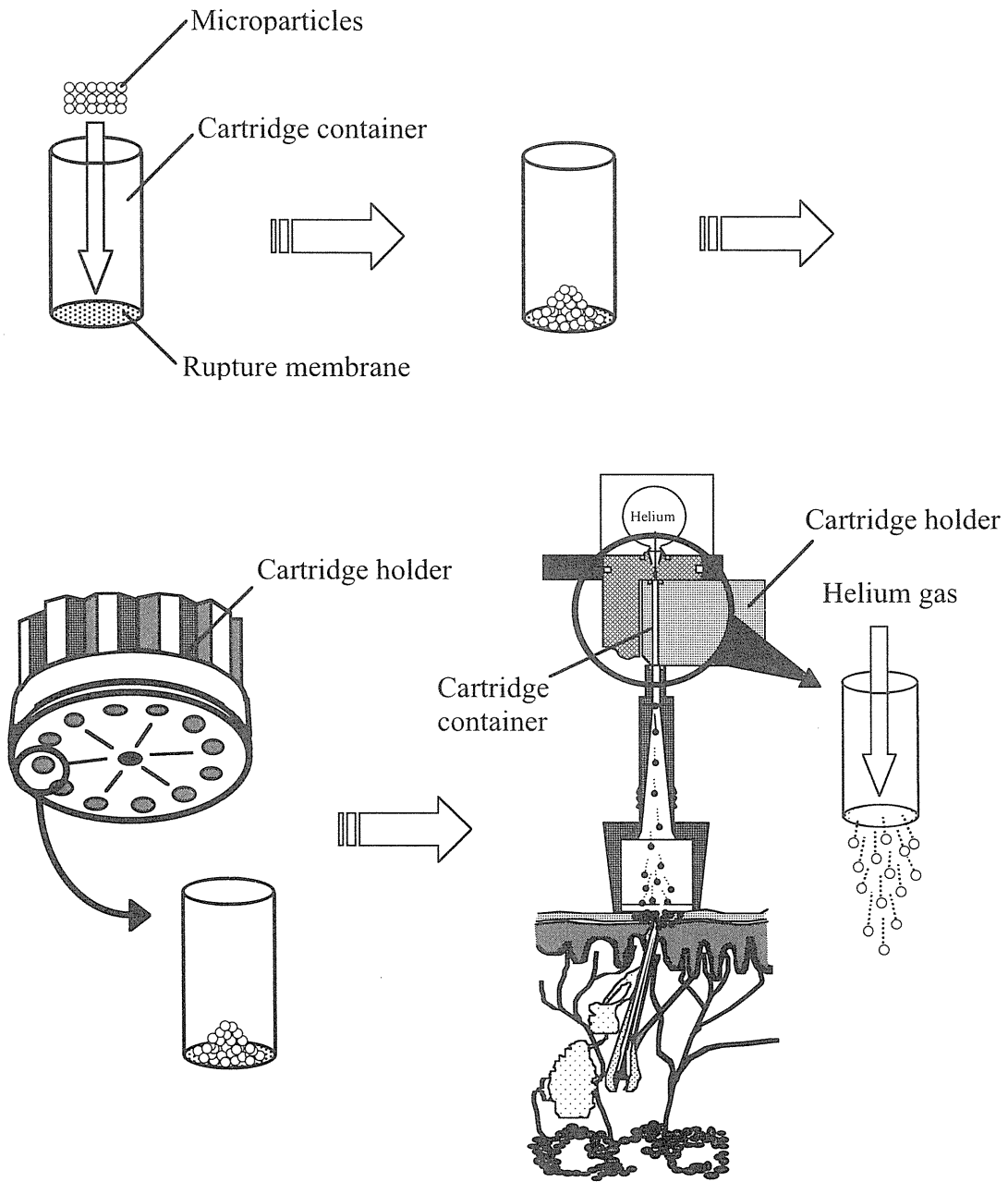


Fig. 3 Microparticles setting and the operation of the Helios™ gun system

Table 1 Conditions for operating the Helios™ gun system

Gas		Helium
Rupture membrane		Polyvinyl chloride
Rupture membrane thickness (μm)		10
Cartridge container diameter (mm)	OD	3
	ID	2
Treated area (cm ²)		5

第 2 節 組織学的検討

前節において、粒子径数十 μm の薬物含有微粒子を皮膚内に導入する目的で、遺伝子銃である Helios™ gun system に工夫を施した。この改良によって、比重が約 1 前後で粒子径数十 μm の微粒子を皮膚内に導入できるかどうかを確認するため、平均粒子径が 45 μm の蛍光 (FITC) 標識ポリスチレンマイクロスフィア (3.0 mg) を、Helios™ gun system を用いてヘアレスラット腹部皮膚内に導入し組織学的に評価した。Fig. 4 に Helios™ gun system を用いてポリスチレンマイクロスフィアをヘリウム圧 100、200 及び 300 psi で皮膚内に導入した直後の皮膚組織切片の共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真を示す。いずれのヘリウム圧を用いても、皮膚内にマイクロスフィアの蛍光が観察され、Helios™ gun system を用いると、マイクロスフィアが皮膚内に導入されることが明らかになった。また、ヘリウム圧を 100、200 及び 300 psi と高くするにつれて導入されるポリスチレンマイクロスフィアの数が増加し、導入深度は深くなる傾向がみられた。

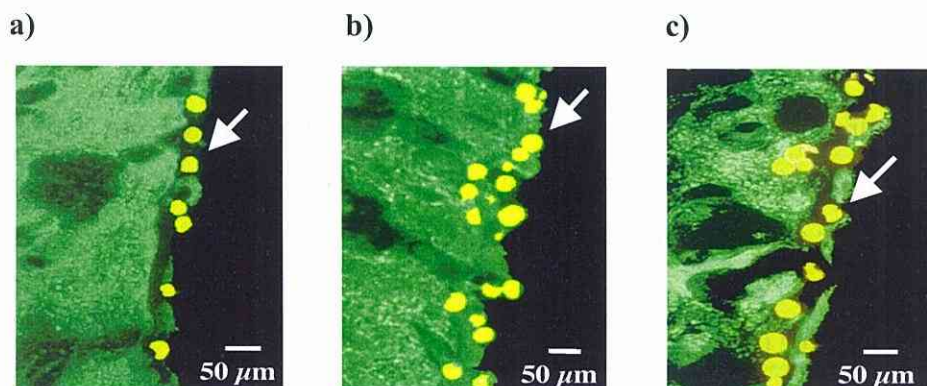


Fig. 4 Confocal laser microphotographs of the cross-section of hairless rat abdominal skin after bombardment of FITC-labeled polystyrene microspheres with 45 μm in mean diameter at different pressures using the Helios™ gun system

Helium pressure ; a) 100 psi, b) 200 psi, c) 300 psi

Arrows indicate FITC-labeled polystyrene microspheres with 45 μm in mean diameter.

第3節 本章の考察

本章では、遺伝子導入法の一つであり、高い遺伝子導入効率を示す particle bombardment system を応用し、粉末薬物の皮膚内送達が可能かどうかを既に市販されている Helios™ gun system を用いて検討した。Helios™ gun system は本来遺伝子導入装置であるため、これを粉末薬物の皮膚内送達に応用するのにいくつかの問題点があった。それは、金粒子の体内蓄積性、定量的な投与量のコントロール、薬物放出制御等である。そこで、金粒子の代わりに生分解性高分子物質を用い、粒子の比重を大きくする代わりに粒子の粒子径を大きくすることで個々の粒子の質量を増大させた。また、カートリッジのチューブを二つに分離するステンレス製のチューブに代え、その間に破裂膜としてポリ塩化ビニルフィルムを挟んで、チューブの底に破裂膜を装着したカートリッジコンテナを作製し、これを粒子径数十 μm の微粒子の皮膚内導入に用いた。その結果、あらかじめ設定した既知量の微粒子を充填するこ

とが可能となった。また、第 2 節では、実際に Helios™ gun system を用いて比重が 1 前後で粒子径が数十 μm の微粒子を皮膚内に導入できるかどうかを平均粒子径が 45 μm の蛍光標識ポリスチレンマイクロスフィアを用いて組織学的に検討した。その結果、Helios™ gun system により、マイクロスフィアが皮膚内に導入されることを証明し、さらに、ヘリウム圧に依存して導入されるマイクロスフィアの絶対量は多くなり、導入深度は深くなる傾向にあることが明らかとなった。これらの結果は破裂膜を装着した新規カートリッジコンテナーが既知量の粒子径数十 μm の微粒子を安定に保持し、これら微粒子の定量的な皮膚内導入を可能にすることを示唆している。

第2章 薬物含有微粒子の皮膚内導入に関する検討

前章において、Helios™ gun system を用いて、比重が1前後で粒子径が数十 μm の微粒子を皮膚内に導入できることを定性的に証明した。

そこで本章では、薬物含有微粒子を効率良く皮膚内に導入するための条件を設定するために、モデル薬物として皮膚から血中への移行が確認されている疎水性薬物のインドメタシン (IDM) を、微粒子の壁材料として生体適合性及び生体内分解性に優れている合成高分子物質のポリ乳酸 (PLA) を選択して、種々粒子径の IDM 含有 PLA マイクロスフィア (MS) を調製し、IDM の皮膚内導入率に対する噴射駆動力であるヘリウム圧、IDM 含有 PLA MS の粒子径及び投与量の影響を検討した。また、皮膚安全性の観点から、IDM 含有 PLA MS 導入後の皮膚の紅斑を Draize score を用いて評価し、上記の影響について検討した。さらに Helios™ gun system を用いた IDM 含有 PLA MS の皮膚内導入において、効果的かつ安全性の高い投与条件について検討した。

第1節 IDM 含有 PLA MS の調製及び特性

本節では、Helios™ gun system を用いて、薬物含有微粒子を効率良く皮膚内に導入するための投与条件を設定するために、導入用微粒子として IDM 含有 PLA MS を選択し、Chart 1 に示す o/w 型エマルジョン液中乾燥法にて調製した⁴⁹⁾。

粒子径の影響を検討するために、得られたマイクロスフィアをステンレス製のふるいを用いて粒子径が 20-38、

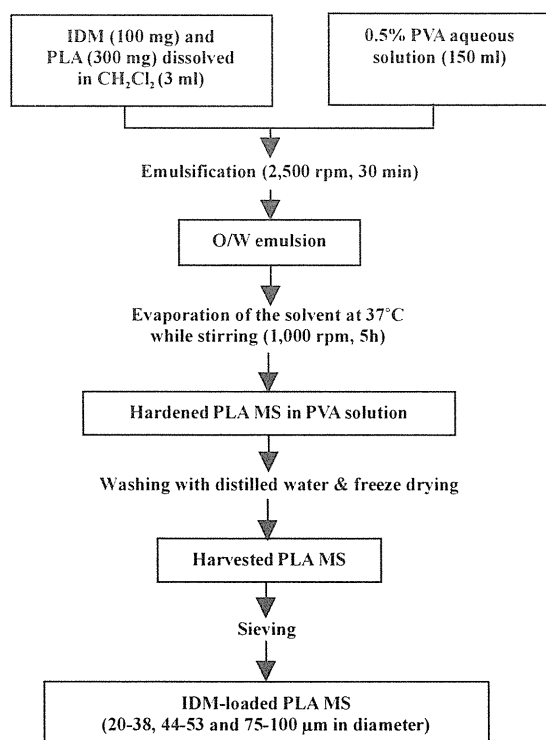


Chart 1 Preparation method of PLA MS

44-53 及び 75-100 μm に分級した。

Fig. 5 に調製した粒子径 75-100 μm の IDM 含有 PLA MS の走査型電子顕微鏡写真を示す。形状はほぼ球形であった。

それぞれの粒子径の IDM 含有 PLA MS の平均粒子径（体積-重量平均）及び IDM 含有率を Table 2 に示す。粒子径が小さくなるにしたがって薬物の含有率も低下する傾向が認められた。

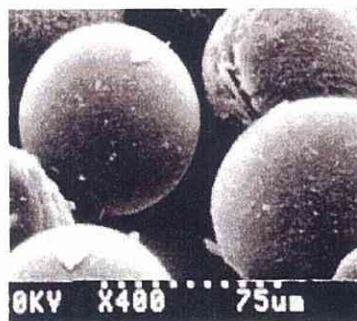


Fig. 5 Scanning electron micrograph of IDM-loaded PLA MS with 75-100 μm in diameter

Fig. 6 に調製した種々粒子径の IDM 含有 PLA MS からの IDM の放出を示す。薬物の放出速度は今回選択した粒子径の間でほとんど変わらず、同じ様な放出挙動を示した。しかし、文献値⁴⁹⁾よりも速い IDM の放出が観察され、いずれの粒子径の IDM 含有 PLA MS も 30 分までにそのほとんどが放出された。この結果から、IDM は比較的 PLA MS の表面近くに封入されていることが考えられた。

Table 2 Mean particle size and IDM content of PLA MS with different size ranges

Size range (μm)	Mean particle size* (μm)	IDM content (%)
20-38	30.3 \pm 7.33	10.4
44-53	49.8 \pm 6.41	18.8
75-100	92.2 \pm 12.6	22.2

*Volume-weighted mean \pm S.D.

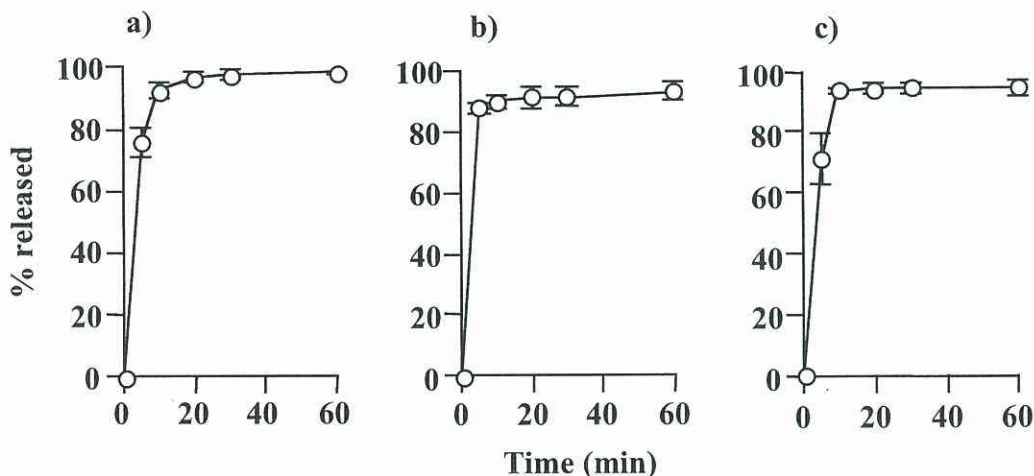


Fig. 6 In vitro IDM release from PLA MS
Particle size ranges ; a) 20-38 μm , b) 44-53 μm , c) 75-100 μm
Each data point represents the mean and standard error (n=3).

第 2 節 IDM 皮膚内導入率に対するヘリウム圧及び粒子径の影響

前節で調製した IDM 含有 PLA MS を、Helios™ gun system を用いて、種々条件下でヘアレスラット腹部皮膚に投与したときの、IDM 皮膚内導入率を測定し、皮膚内導入率に対する噴射駆動力であるヘリウム圧、PLA MS の粒子径及び投与量の影響を検討した^{48,50)}。

Fig. 7 に Helios™ gun system を用いて IDM 含有 PLA MS 3.0 mg をヘアレスラット腹部皮膚内に投与したときの、IDM 皮膚内導入率に対するヘリウム圧及び粒子径の影響を示す。全ての条件下で IDM 含有 PLA MS は皮膚内に導入されることが明らかとなった。

それぞれの粒子径において、IDM 皮膚内導入率はヘリウム圧に依存して増大する傾向が認められた。特に粒子径 44-53 及び 75-100 μm の IDM 含有 PLA MS では顕著であった (one-way ANOVA, $P < 0.05$)。

一方、ヘリウム圧 100 及び 200 psi において、IDM 皮膚内導入率に対する粒子径の影響は認められなかった (Fisher's pairing t -test, $P > 0.05$)。この原因の一つに、これらのヘリウム圧では粒子サイズ効果 (質量効果) が不十分であることが考えられる。これに対し、ヘリウム圧 300 psi での IDM 皮膚内導入率は粒子径の増加とともに増加した (IDM 皮膚内導入率に対する粒子径の影響は認められなかったが (one-way ANOVA, $P > 0.05$)、粒子径 20-38 及び 75-100 μm の IDM 含有 PLA MS で得られる IDM 皮膚内導入率の間に有意な差が認められた (Fisher's pairing t -test, $P < 0.05$))。粒子径の小さい PLA MS (20-38 μm) は他の粒子径よりも比較的粒度分布が広いので (Table 2)、この粒子径範囲の中の大きな PLA MS が皮膚内に容易に導入されたと考えられ、それゆえに、粒子径 20-38 及び 44-53 μm の IDM 含有 PLA MS で得られる IDM 皮膚内導入率の間に有意な差が認められなかったと考えられる。

これらの結果から、Helios™ gun system を用いた IDM 含有 PLA MS の投与後の IDM 皮膚内導入率はヘリウム圧に強く依存し、また、ヘリウム圧 300 psi では粒子径によっても影響を受けることが明らかとなった。

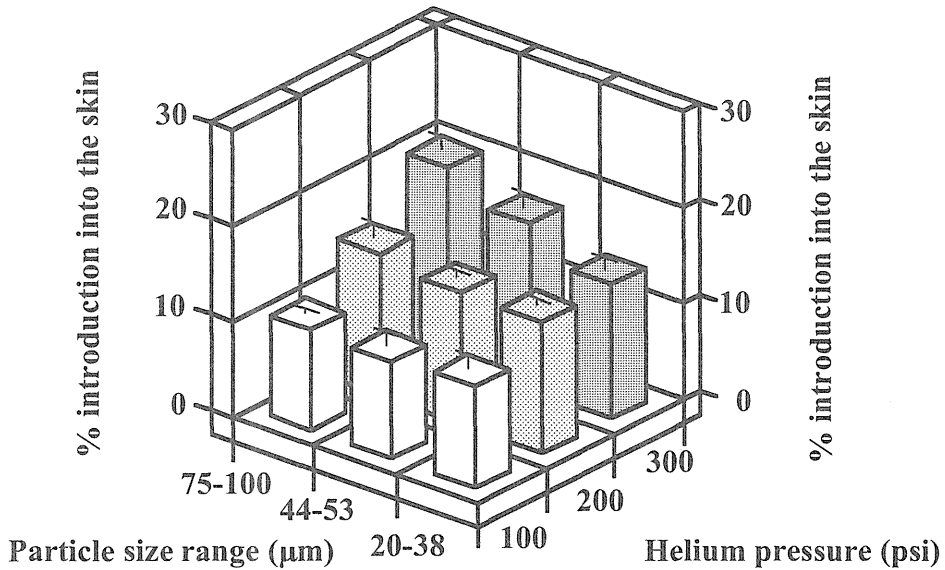


Fig. 7 Relationship between helium gas pressure, particle size and the % introduction of IDM into the skin after bombardment of IDM-loaded PLA MS using the Helios™ gun system

Bombardment dose ; 3.0 mg

There was a significant difference between the % introductions obtained at different helium pressures in particle size of 44-53 and 75-100 μm (one-way ANOVA, $P < 0.05$).

There was no significant difference between the % introductions obtained with different particle sizes at all helium pressure (one-way ANOVA, $P > 0.05$).

There was a significant difference between the % introductions after bombardment of PLA MS of 20-38 and 75-100 μm in diameter at a helium pressure of 300 psi (Fisher's pairing t -test, $P < 0.05$).

Each column represents the mean and standard error ($n = 3-4$).

Fig. 8 に噴射後カートリッジコンテナ内に残存した IDM 量を示す。いずれの粒子径の IDM 含有 PLA MS も、残存率は 1%未満と非常に低く、ほぼ全量がカートリッジコンテナ内から皮膚に向かって噴射されていることが明らかとなった。この結果は、今回粒子径が数十 μm のマイクロスフィアの投与用に改良した破裂膜を装着した新規カートリッジコンテナが Helios™ gun system からのマイクロスフィアの噴射に関して正しく機能を果たしていることを示している。

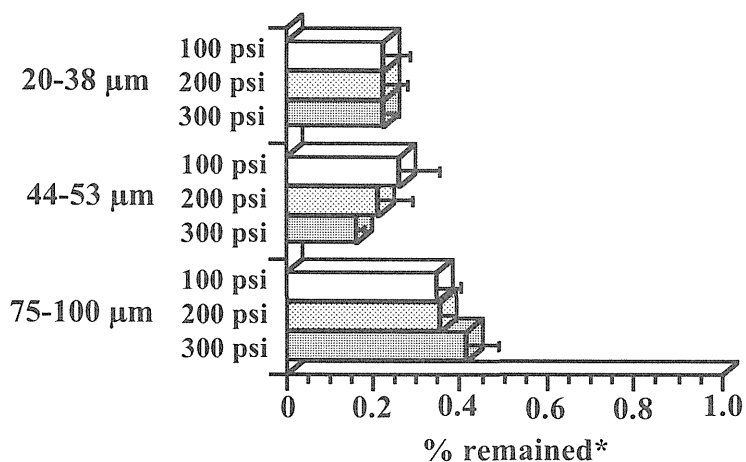


Fig. 8 Percentage remained of IDM in the cartridge container

* % remained ; (Amount of IDM remained in the cartridge container after bombardment / initial amount of IDM) x 100

Bombardment dose ; 3.0 mg

Each column represents the mean and standard error (n = 3-8).

第3節 皮膚障害性に対するヘリウム圧及び粒子径の影響

前節の結果から、高いヘリウム圧を用いると高い IDM 皮膚内導入率が得られ、また高いヘリウム圧においては大きな粒子径を用いることで高い導入率が得られることが示唆された。しかしながら、このシステムを粉末薬物の皮膚内送達に応用するためには皮膚への障害性が問題となってくる。そこで次に、皮膚の安全性の観点から、本システムの最適な条件について検討した⁴⁸⁾。Fig. 9 に IDM 含有 PLA MS 3.0 mg を Helios™ gun system を用いて皮膚内に導入してから 1 時間後のヘアレスラット腹部皮膚写真を示す。皮膚の紅斑は用いたほとんどのヘリウム圧で観察され、キャピラリーバースト（毛細血管の破裂）により生じたと考えられた。ヘリウム圧を高くすると、皮膚の紅斑がより強く認められ、皮膚に対する障害性も高くなることが示唆された。すなわち、Fig. 7 の結果から皮膚の紅斑と IDM 皮膚内導入率との間には相関関係が成立していると考えられた。Table 4 に各粒子径の IDM 含有 PLA MS 3.0 mg を種々ヘリウム圧で投与してから 1 時間後の Draize score (Table 3)^{51, 52)}を

示す。Draize score に対するヘリウム圧及び粒子径の影響の有意性は統計学的には認められなかったが (Friedman test, $P > 0.05$)、Draize score はヘリウム圧の増加に伴い増大する傾向が認められた。一方、種々粒子径の IDM 含有 PLA MS 導入後の Draize score は各ヘリウム圧でほぼ同等であった。従って、高いヘリウム圧で得られる高い IDM 皮膚内導入率は、高い Draize score を示す傾向にあることが明らかとなった。しかし、これらの皮膚の紅斑は時間の経過と共に徐々に減弱していく傾向がみられ、投与後 2 日目にはほぼ完全に紅斑が消失していた。

これまでの検討結果から、より粒子径の大きなマイクロスフィア及びより高いヘリウム圧を用いると、より高い IDM 皮膚内導入率が得られるが、皮膚に対する障害性もより大きくなることが示唆された。従って、皮膚内導入率が高くても皮膚の紅斑を極力抑えることのできる改善策が必要と思われた。

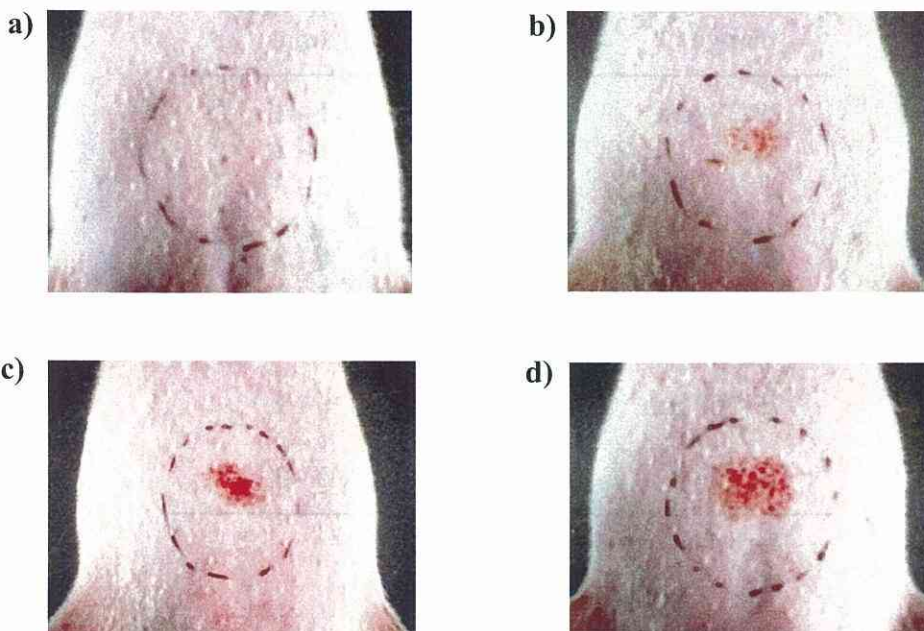


Fig. 9 Photographs of the abdomen of a hairless rat 1 hour after bombardment of IDM-loaded PLA MS using the Helios™ gun system

Bombardment dose ; 3.0 mg

a) 44-53 μm , 100 psi, b) 44-53 μm , 200 psi, c) 44-53 μm , 300 psi, d) 75-100 μm , 300 psi

Table 3 Scoring system used to the skin reaction after bombardment of IDM-loaded PLA MS using the Helios™ gun system

Effect	Value	Observation
Erythema	0	No erythema
	1	Very slight (barely perceptible)
	2	Well defined
	3	Moderate to severe
	4	Severe

Table 4 Draize score of the skin reaction after bombardment of IDM-loaded PLA MS using the Helios™ gun system

Particle size range	Helium pressure	Draize score range
20-38 μm	100 psi	1 - 1
	200 psi	1 - 2
	300 psi	2 - 3
44-53 μm	100 psi	0 - 0
	200 psi	1 - 2
	300 psi	2 - 3
75-100 μm	100 psi	0 - 1
	200 psi	1 - 2
	300 psi	2 - 3

Each data represents the range (n=3)

第4節 IDM 皮膚内導入率及び皮膚障害性に対する投与量の影響

前節において、より大きな粒子径及びより高いヘリウム圧を用いることで、より高い皮膚内導入率が得られる一方で、それに伴い皮膚障害性も増大することが明らかとなった。

そこで本節では IDM 含有 PLA MS をより効率的に皮膚内に導入でき、さらに皮膚への障害を軽減させるために、IDM 皮膚内導入率及び皮膚障害性に対する PLA MS の投与量の影響について検討した⁴⁸⁾。

Fig. 10 に Helios™ gun system を用いて、種々粒子径の IDM 含有 PLA MS を種々ヘリウム圧でヘアレスラット腹部皮膚に投与した後の PLA MS の投与量と IDM 皮膚内導入率との関係を示す。各々の粒子径において、全てのヘリウム圧で投与量の減少とともに、皮膚内導入率は増加した（ただし、統計学的には、one-way ANOVA, $P > 0.05$ for 20-38 μm in diameter ; $P < 0.05$ for 44-53 μm in diameter ; $P < 0.01$ for 75-100 μm in diameter)。これは投与量の減少により、粒子同士の衝突や粒子とカートリッジコンテナの内壁との摩擦係数が減少したために、粒子速度が上昇して、皮膚内導入率の増加をもたらしたと考えられる。これらの結果は、投与量を減少させることにより、IDM 含有 PLA MS をより効率的に皮膚内に導入できることを示唆している。

また、投与量 0.5 及び 1.0 mg のとき、各々の粒子径においてヘリウム圧に依存して導入率が増加する傾向にあったが、統計学的に有意でなかった。（Fisher's pairing t -test, $P > 0.05$ ）。

以上の結果から、より少ない投与量でより大きな微粒子を用いると、皮膚内導入率は増加し、特に粒子径 75-100 μm の IDM 含有 PLA MS を用いると、粒子径 20-38 及び 44-53 μm の IDM 含有 PLA MS を用いたときよりも、より効果的に皮膚内に導入されることが明らかとなった。しかしながら、投与量の減少がより効果的な皮膚内導入率をもたらす一方で、実際に皮膚内に導入される IDM 絶対量は減少するという事に留意しなければならない。

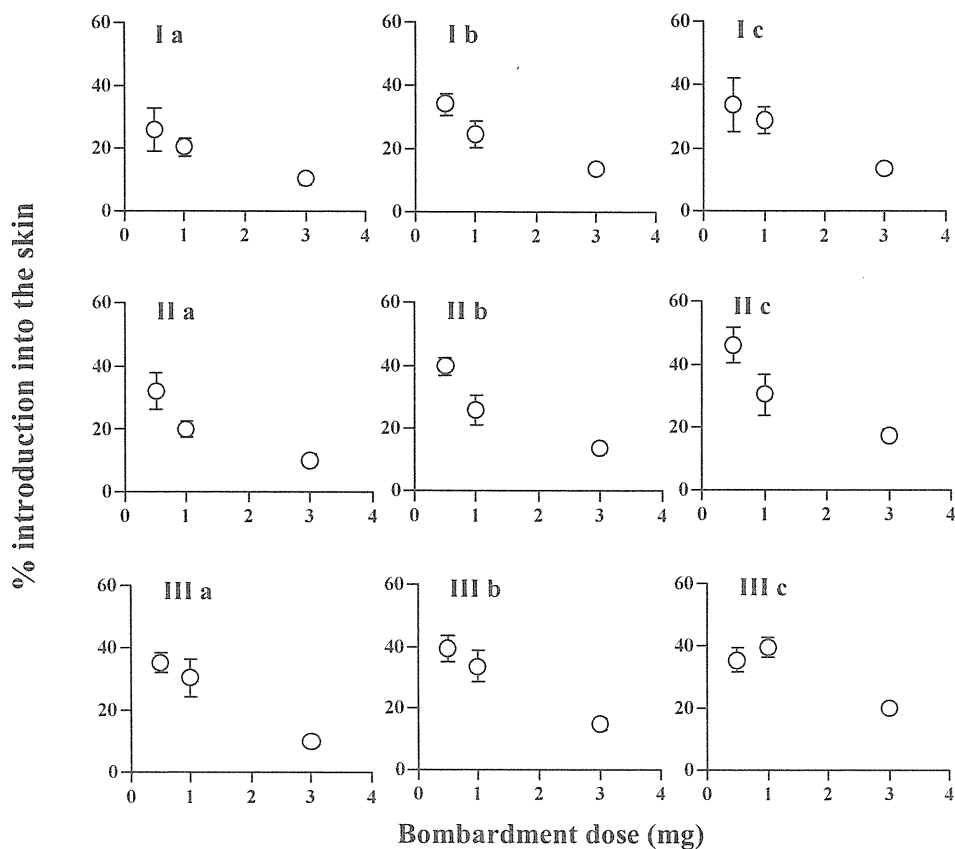


Fig. 10 Relationship between bombardment dose and the % introduction of IDM into the skin after bombardment of IDM-loaded PLA MS using the Helios™ gun system

Particle size range – I ; 20-38 μm, II ; 44-53 μm, III ; 75-100 μm

Helium pressure – a ; 100 psi, b ; 200 psi, c ; 300 psi

There was a significant difference between the % introductions obtained at different bombardment dose at all helium pressures in particle size of 44-53 and 75-100 μm (one-way ANOVA, $P < 0.05$).

There was no significant difference between the % introductions obtained with different helium pressures at all particle sizes at doses of 0.5 and 1.0 mg (one-way ANOVA, $P > 0.05$).

There was a significant difference between the % introductions obtained at doses of 0.5 and 3.0 mg at all helium pressures and particle sizes (Fisher's pairing t -test, $P < 0.05$).

Each data point represents the mean and standard error (n=3-5).

次に、皮膚の安全性に対する投与量の効果を検討した。Table 5 に Helios™ gun system を用いて、各粒子径の IDM 含有 PLA MS 0.5 及び 1.0 mg を種々ヘリウム圧で投与してから 1 時間後の Draize score を示す。統計学的に Draize score に対してヘリウム圧及び IDM 含有 PLA MS の粒子径は影響を及ぼさなかったが (Friedman test, $P > 0.05$)、各粒子径で全てのヘリウム圧において、投与量 0.5 及び 1.0 mg のときの Draize score は Table 4 で示した投与量 3.0 mg のときよりも減少した、つまり、微粒子の投与量の減少により、皮膚への障害は抑えられる傾向が認められた。また、全ての粒子径において、ヘリウム圧を減少させることで Draize score は減少した。Fig. 11 に種々投与量の粒子径 75-100 μm の IDM 含有 PLA MS をヘリウム圧 300 psi で投与してから 1 時間後のヘアレスラット腹部皮膚写真を示す。投与量 0.5 (Fig. 11a) 及び 1.0 mg (Fig. 11b) で投与した後の皮膚紅斑の程度は投与量 3.0 mg (Fig. 11c) のときと比較して非常に小さかった。同様な傾向が粒子径 20-38 及び 44-53 μm の IDM 含有 PLA MS の投与後にも観察された。以上の結果から、微粒子の投与量を減少することで、皮膚障害性は抑えられることが明らかとなった。これは、皮膚に衝突する微粒子の量が減少したことに起因すると考えられた。

以上本節をまとめると、particle bombardment system において、粒子径の大きな微粒子を、投与量を少なくして、高いヘリウム圧で皮膚内に導入することが、より効率的でかつ安全性の高い皮膚内導入方法であると考えられた。しかしながら、投与量 0.5 及び 1.0 mg での皮膚内に導入された IDM 絶対量は投与量 3.0 mg のときよりも低くなることが明らかとなった。よって、薬理効果を得るために投与量の多い薬物について、このシステムを用いるためにはさらなる工夫が必要と思われた。

Table 5 Relationship between helium gas pressure, particle size and Draize score after bombardment of IDM-loaded PLA MS using the Helios™ gun system

Particle size range	Helium pressure	Draize score range
a) at a dose of 0.5 mg		
20-38 μm	100 psi	0 - 0
	200 psi	1 - 1
	300 psi	1 - 1
44-53 μm	100 psi	0 - 0
	200 psi	0 - 1
	300 psi	1 - 2
75-100 μm	100 psi	0 - 0
	200 psi	1 - 1
	300 psi	1 - 2
b) at a dose of 1.0 mg		
20-38 μm	100 psi	0 - 1
	200 psi	0 - 1
	300 psi	0 - 2
44-53 μm	100 psi	0 - 0
	200 psi	0 - 2
	300 psi	0 - 3
75-100 μm	100 psi	0 - 0
	200 psi	1 - 1
	300 psi	1 - 2

There was no significant difference between the Draize score obtained at different helium pressures, with different particle sizes and at different bombardment doses of PLA MS (Friedman test, $P > 0.05$).

Each data represents the range (n = 3-15).

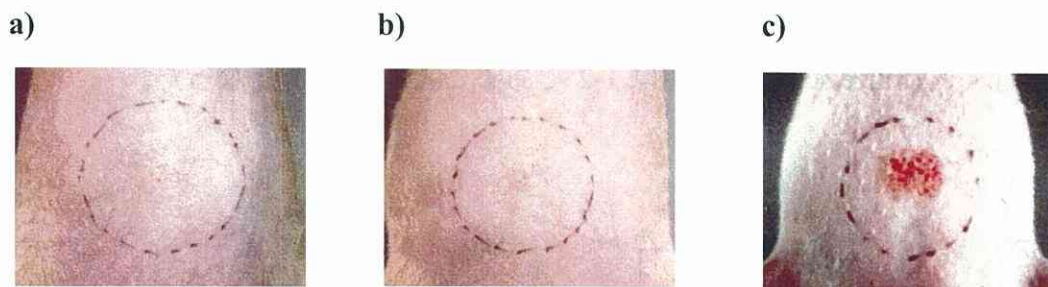


Fig. 11 Photographs of the abdomen of a hairless rat 1 hour after bombardment of IDM-loaded PLA MS using the Helios™ gun system

Bombardment dose ; a) 0.5 mg, b) 1.0 mg, c) 3.0 mg

Particle size range; 75-100 μm , Helium pressure ; 300 psi

第 5 節 IDM 皮膚内導入率及び皮膚障害性に対する複数回投与の影響

前節において、Helios™ gun system を用いて、粒子径の大きな微粒子を投与量を少なくして高いヘリウム圧で投与すると、高い皮膚内導入率が得られ、さらに、皮膚への障害も減少することを明らかにした。しかしながら、皮膚内に導入される IDM 絶対量は、微粒子の投与量に依存した。そこで本節では、この問題を改善するために、1 回当たりの投与量を少なくし、粒子径の大きな微粒子を異なる部位に複数回投与したときの皮膚内導入量及び皮膚障害性に対する影響を検討した⁴⁸⁾。

Fig. 12 に粒子径 75-100 μm の IDM 含有 PLA MS 1.0 mg をヘリウム圧 300 psi で腹部皮膚の異なる 3 箇所を 1 回ずつ投与したときの IDM 皮膚内導入量及びヘアレスラット腹部皮膚写真を示す。Fig. 12a に示すように、IDM 含有 PLA MS 1.0 mg を腹部皮膚の異なる 3 箇所を 1 回ずつ投与したときの IDM 皮膚内導入量は 3.0 mg を 1 箇所を 1 回投与したときよりも有意に高くなることが明らかとなった (Fisher's pairing *t*-test, $P < 0.05$)。この結果は、1 回の投与量を少なくして異なる部位に複数回投与すると、より効率的に IDM 含有 PLA MS を皮膚内に導入でき、導入量も増加できることを示している。また、皮膚への障害

に関しても、Fig. 12b に示すように、全ての部位において、皮膚の障害は非常に少なく、Draize score の範囲は 1-2 であることが明らかとなった。

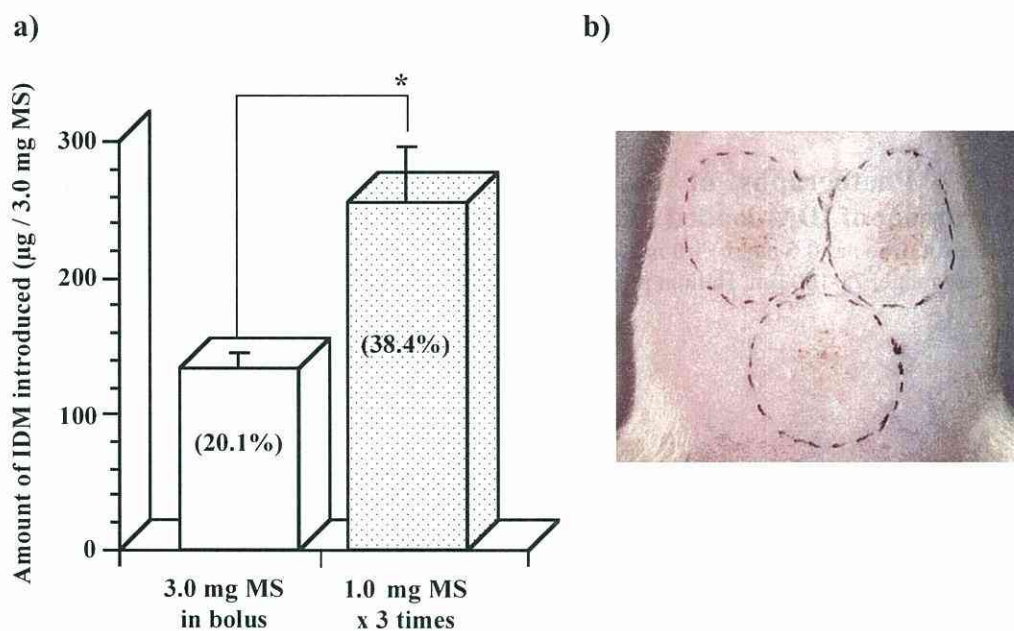


Fig. 12 Amount of IDM introduced into the skin and photograph of the abdomen of a hairless rat after discrete bombardment of IDM-loaded PLA MS using the Helios™ gun system

a) amount of IDM introduced into the skin, b) photograph of bombarded skin

Bombardment method ; 3.0 mg MS in bolus, 1.0 mg MS x 3 times

Particle size range ; 75-100 µm, Helium pressure ; 300 psi

Numbers in parentheses indicate the % introduction of IDM into the skin.

*Significant differences, Fisher's pairing *t*-test, $P < 0.05$

Each data column represents the mean and standard error (n=4-5).

第 6 節 本章の考察

本章では、導入用粒子として種々粒子径の IDM 含有 PLA MS を調製し、particle bombardment system を用いた IDM 含有 PLA MS の皮膚内導入に対するヘリウム圧、粒子径及び投与量の影響を検討し、皮膚内導入性と安全性の観点から particle bombardment system を用いたときの適切な条件を検討した。その結果、particle bombardment system により、IDM 含有 PLA MS を直接皮膚内に導入できることが明らかとなった。また、IDM 皮膚内導入率はヘリウム圧及び微粒子の粒子径を調節することで増加し、より効果的な IDM 皮膚内導入率及び皮膚障害性の軽減は投与量を制御することで得られることが明らかとなった。従って、ヘリウム圧と投与量の適切な組み合わせにより、様々な薬物の薬理作用を発揮するのに必要とされる量を、粒子径の大きな微粒子を用いて送達できると考えられる。以上の結果から、particle bombardment system において、高いヘリウム圧を用い、粒子径の大きな微粒子を少ない投与量で、単回及び異なる部位に複数回投与することが、効果的でかつ安全性の高い皮膚内導入法であると考えられた。

また、噴射後の新規カートリッジコンテナー内に残存した IDM 量が全てのヘリウム圧において 1%未満であったことから、少なくとも投与量の 99%以上がカートリッジコンテナー内から皮膚に向かって噴射されていることが示唆された。この結果から、前章と同様にこの新規カートリッジコンテナーが粒子径数十 μm の微粒子の定量的な導入に関して正しく機能していることを示している。

第 3 章 Particle bombardment system による IDM の全身送達に関する 検討

前章までに著者は、新規カートリッジコンテナを装着した Helios™ gun system を用いて微粒子を投与すると、微粒子が皮膚内に導入されることを明らかにし、その皮膚内導入率は用いるヘリウム圧及び微粒子の粒子径を調節することで増大し、投与量を制御することでより効果的な皮膚内導入率及び皮膚障害性の軽減が得られることを明らかにした。この導入された微粒子から、さらに全身循環へ効率的に送達されれば、局所送達システムとしてばかりでなく、全身送達システムとして利用できるのも、その価値が大いに高まることが期待される。そこで本章では、IDM 含有 PLA MS を用いて、Helios™ gun system により IDM が全身に送達されるかどうかを血中の IDM 濃度推移及び薬動学的パラメータから評価し、IDM 血中濃度推移及び薬動学的パラメータに対するヘリウム圧、IDM 含有 PLA MS の粒子径及び投与量の影響について調べた。また、IDM 皮膚内導入率及び導入量に関し効果的であった複数回投与の効果についても同様に検討した。

第 1 節 IDM 血中濃度推移に対するヘリウム圧及び粒子径の影響

Helios™ gun system を用いて IDM 含有 PLA MS を投与すると、その IDM 皮膚内導入率はヘリウム圧及び IDM 含有 PLA MS の粒子径の増大に伴い増加することが既に示唆されている。そこで本節では、Helios™ gun system を用いて皮膚内に導入された IDM 含有 PLA MS から IDM が放出され全身送達されるかどうかを投与後の血中 IDM 濃度を測定して調べ、IDM 血中濃度推移及び薬動学的パラメータに対するヘリウム圧、IDM 含有 PLA MS の粒子径の影響について検討した。また、これらの影響と IDM 皮膚内導入率との相関性についても検討した⁵³⁾。

Fig. 13 に Helios™ gun system を用いて種々粒子径 (20-38、44-53 及び 75-100

μm) の IDM 含有 PLA MS 1.0 mg を種々ヘリウム圧で投与した後の IDM 血中濃度推移を、Table 6 にその結果から得られた薬動学的パラメータ及び IDM 皮膚内導入率を示す。いずれの条件下においても、IDM は血中に出現し、Helios™ gun system を用いた particle bombardment system が薬物の局所送達のみならず、全身送達においても応用可能であることが示唆された。先の PLA MS からの IDM の放出実験の結果から推測すると、皮膚に導入された PLA MS からの IDM の放出は速いと考えられる (Fig. 6)。コントロールとして IDM を pH 7.4 リン酸緩衝液に溶解したものを皮内注射した結果、最高血中濃度 (C_{max}) がわずかに数分と速く静脈内注射したときの kinetics とほぼ同様であった (Table 7)。従って、IDM を PLA MS 中に封入して皮内に導入した場合、IDM 血中濃度がコントロールされたのは、IDM の皮膚中での溶解が律速となった可能性が考えられた。さらに、IDM の最高血中濃度到達時間 (T_{max}) は各粒子径でヘリウム圧に依存して短くなる傾向にあり、皮内注射時の消失パラメータ (Table 7) を用いてデコンポリューション法から算出した吸収速度定数 (k_a) もまた各粒子径でヘリウム圧に依存して大きくなる傾向が認められ、いずれの粒子径においてもヘリウム圧 200 及び 300 psi のときの k_a は 100 psi のときよりも高かった。また、IDM の最大吸収速度 (MAR) も各粒子径においてヘリウム圧に依存して増加し、その増加は k_a よりも顕著であった。吸収後の IDM のクリアランスはいずれの場合も等しいと考えられるので、IDM の皮膚中での溶解速度だけが血中動態の決定因子であるならば、 k_a 及び MAR がヘリウム圧に依存して大きくなることはない。従って、 k_a 及び MAR が大きくなったのは、IDM の皮膚内導入量が増加したことによると考えられた。

また、各粒子径の IDM 含有 PLA MS において、ヘリウム圧を高くするにつれて IDM の血中濃度は高くなり、それに伴って C_{max} 、24 時間までの血中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-24h}) 及び相対的バイオアベイラビリティ (F_{0-24h}) もヘリウム圧に依存して増加し、IDM 皮膚内導入率に相関した (Table 6)。つまり、高いヘリウム圧を用いると高い IDM 皮膚内導入率が得られ、結果として効率良く全身循環系に送達されることが明らかとなった。さらに、各ヘリウム圧において、IDM 血中濃度及び薬動学的パラメータに対する IDM 含有

PLA MS の粒子径の影響を調べた結果、IDM 血中濃度、 C_{max} 及び AUC_{0-24h} は粒子径の増加とともに増加した。これはラット一匹当りの PLA MS 量を統一したために、PLA MS 中の IDM 含量の違いによってラット一匹当りの IDM 投与量が粒子径の増加に伴い増加したものの、その増加よりも粒子径の増加によって得られた IDM の F_{0-24h} の増加の方が大きかったことから、粒子径に依存した F_{0-24h} が得られたと考えられた。また、これらの結果も IDM 皮膚内導入率に相関した。以上の結果より粒子径の大きな微粒子及び高いヘリウム圧を用いることで、皮膚内導入の上昇ばかりでなく、より効率的に IDM を全身送達できることが明らかとなった。

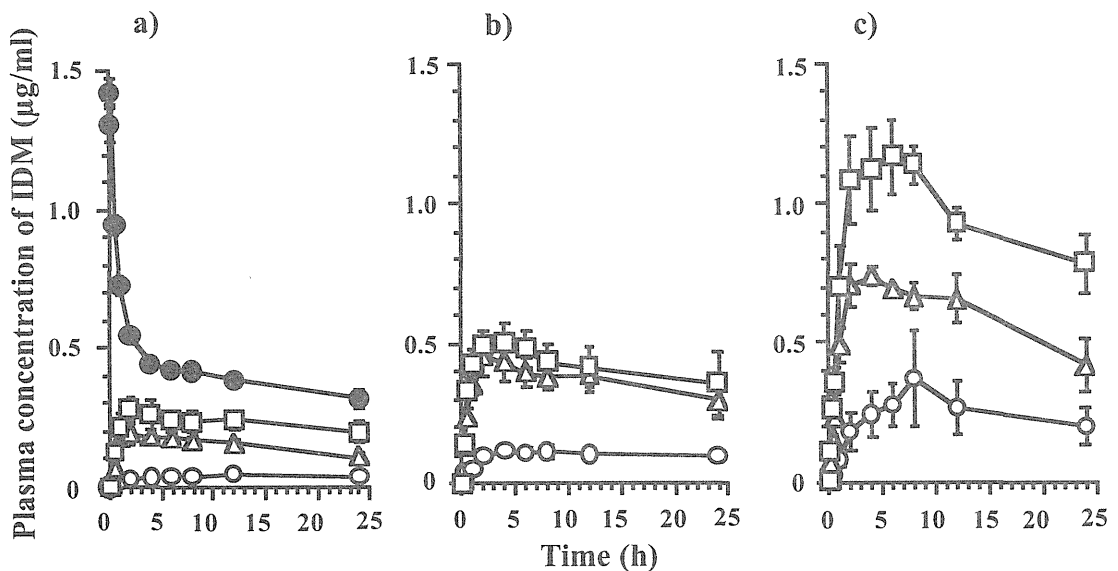


Fig. 13 Plasma concentration of IDM after bombardment of IDM-loaded PLA MS with various particle size ranges at different helium pressures using the Helios™ gun system

Bombardment dose ; 1.0 mg

Particle size ranges; a) 20-38 μm , b) 44-53 μm , c) 75-100 μm

● ; i.c. injection of IDM solution (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Particle bombardment at helium pressure ; ○ ; 100 psi, △ ; 200 psi, □ ; 300 psi

Each data point represents the mean and the standard error ($n = 3-4$).

Table 6 Percentage introduction and pharmacokinetic parameters of IDM after bombardment of IDM-loaded PLA MS using the Helios™ gun system at various conditions

		% introduction	C _{max} (µg/ml)	T _{max} (h)	AUC _{0-24h} (µg•h/ml)	k _a (1/h)	MAR (µg/h)	F _{0-24h} * (%)
<i>i.c.</i>								
IDM solution (100 µg IDM/kg)	—	—	1.42 ± 0.05	0.17 ± 0.00	10.2 ± 0.38	—	—	—
20-38 µm**	100 psi	20.7 ± 3.00	0.05 ± 0.01	12.0 ± 0.00	0.90 ± 0.10	0.171	1.45	2.20
1.0 mg MS/rat	200 psi	24.7 ± 4.11	0.21 ± 0.03	1.67 ± 0.33	3.58 ± 0.29	0.476	15.2	9.04
(104 µg IDM/rat)	300 psi	29.2 ± 4.20	0.28 ± 0.05	5.33 ± 3.33	5.49 ± 0.87	0.473	16.0	13.7
44-53 µm**	100 psi	19.7 ± 2.65	0.13 ± 0.02	6.00 ± 1.54	2.41 ± 0.34	0.271	5.41	3.18
1.0 mg MS/rat	200 psi	25.5 ± 4.61	0.47 ± 0.06	4.00 ± 1.41	8.77 ± 1.32	0.496	27.3	11.7
(188 µg IDM/rat)	300 psi	30.1 ± 6.67	0.53 ± 0.07	2.67 ± 0.67	9.97 ± 1.66	0.499	37.4	13.7
75-100 µm**	100 psi	30.4 ± 6.00	0.39 ± 0.17	6.67 ± 0.67	5.81 ± 2.08	0.187	9.95	6.24
1.0 mg MS/rat	200 psi	33.8 ± 5.17	0.80 ± 0.04	6.00 ± 3.06	14.1 ± 1.01	0.361	39.6	14.7
(222 µg IDM/rat)	300 psi	39.6 ± 3.04	1.21 ± 0.12	6.00 ± 1.15	22.4 ± 2.08	0.346	56.0	22.9

*F_{0-24h} : [(AUC_{bombard0-24h} / Dose_{bombard}) / (AUC_{i.c.0-24h} / Dose_{i.c.})] x 100

** Relationship between the F_{0-24h} and the % introduction at each particle size range, 20-38 µm ; r = 0.990, 44-53 µm ; r = 0.952, 75-100 µm ; r = 0.987

Table 7 Pharmacokinetic parameters of IDM after *i.v.* and *i.c.* injection of IDM solution

	k ₁₂ (1/h)	k ₂₁ (1/h)	k _{el} (1/h)	V ₁ (ml/kg)	V ₂ (ml/kg)	V _{dss} (ml/kg)	CL _{tot} (ml/h/kg)
<i>i.v.</i> (250 µg/kg)	1.18	0.61	0.14	63.2	123.3	186.4	8.86
<i>i.c.</i> (100 µg/kg)	1.21	0.53	0.07	58.1	132.0	190.0	3.91

Each data represents the mean (n = 3).

第 2 節 IDM 血中濃度推移に対する投与量の影響

前章において皮膚内導入率は噴射する微粒子の投与量を減少させることで増加し、また前節での結果からヘリウム圧依存的で粒子径の大きい方が全身送達性に優れていることから、本節では粒子径 75-100 μm の IDM 含有 PLA MS 0.5、1.0 及び 3.0 mg を種々ヘリウム圧で投与したときの、IDM 血中濃度推移及び薬動学的パラメータを測定し、それらに対する投与量の影響を検討した⁵³⁾。

Fig. 14 に Helios™ gun system を用いて、種々投与量の粒子径 75-100 μm の IDM 含有 PLA MS を種々ヘリウム圧で投与した後の IDM 血中濃度推移を、Table 8 にその結果から得られた薬動学的パラメータ及び IDM 皮膚内導入率を示す。各ヘリウム圧において、IDM 含有 PLA MS の投与量を減少させるにつれ、IDM 血中濃度も減少した。また、それに伴い C_{max} 及び $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ も投与量に依存して減少した (Table 8)。これは、前章での導入率の結果とは異なり、

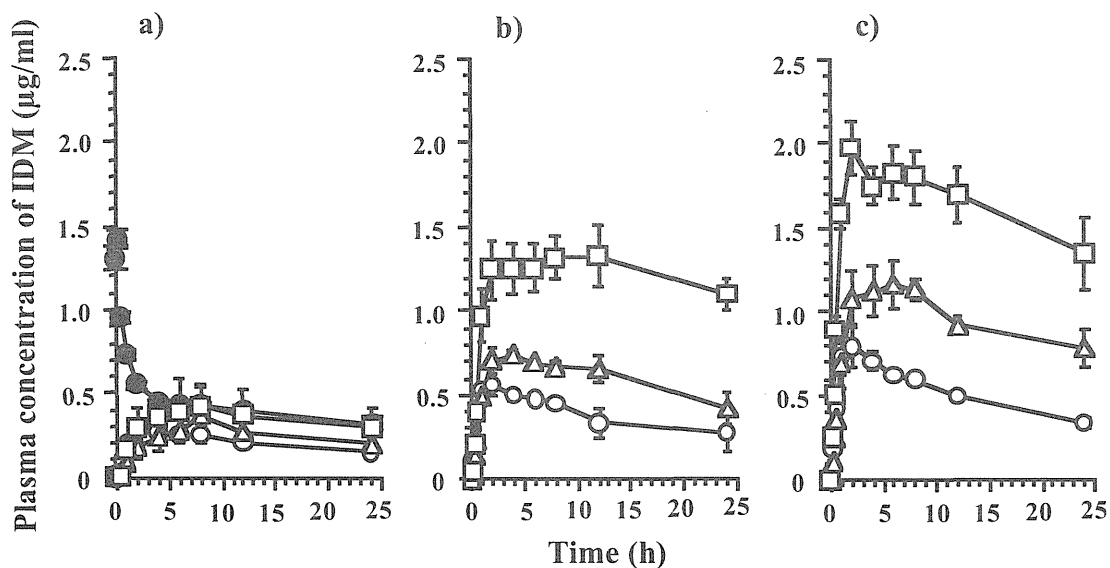


Fig. 14 Plasma concentration of IDM after bombardment of IDM-loaded PLA MS with 75-100 μm in diameter at different helium pressures using the Helios™ gun system

Helium pressure; a) 100 psi, b) 200 psi, c) 300 psi

● ; *i.c.* injection of IDM solution (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Particle bombardment at dose; ○ ; 0.5 mg, △ ; 1.0 mg, □ ; 3.0 mg

Each data point represents the mean and the standard error ($n = 3-6$).

投与量の減少は、IDM の血中動態に対して効果的ではないことを示している。しかし、 F_{0-24h} は IDM 含有 PLA MS の投与量を減少させると増加し、IDM 皮膚内導入率と関連した (Table 8)。よって、投与量の減少は、効率的に IDM 含有 PLA MS を皮膚内に導入できるものの、吸収絶対量は減少し血中濃度は低くなるため、全身送達の観点から用いる薬物 (用量の多い薬物) によっては、効果的ではないと考えられた (ただし、用量の少ない薬物では効果的であると思われる)。

Table 8 Percentage introduction and pharmacokinetic parameters of IDM after bombardment of IDM-loaded PLA MS using the Helios™ gun system at various conditions

		% introduction	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	T_{max} (h)	AUC_{0-24h} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	F_{0-24h}^* (%)
<i>i.c.</i>						
IDM solution (100 μg IDM/kg)		—	1.42 ± 0.05	0.17 ± 0.00	10.2 ± 0.38	—
75-100 μm	100 psi	35.4 ± 2.97	0.29 ± 0.05	2.67 ± 0.67	4.87 ± 0.54	9.41
0.5 mg MS/rat	200 psi	39.3 ± 4.29	0.58 ± 0.05	2.00 ± 0.00	9.65 ± 1.31	19.3
(111 μg IDM/rat)	300 psi	35.6 ± 4.16	0.81 ± 0.11	2.67 ± 0.67	12.5 ± 0.78	25.0
75-100 μm	100 psi	30.4 ± 6.00	0.39 ± 0.17	6.67 ± 0.67	5.81 ± 2.08	6.24
1.0 mg MS/rat	200 psi	33.8 ± 5.17	0.80 ± 0.04	6.00 ± 3.06	14.1 ± 1.01	14.7
(222 μg IDM/rat)	300 psi	39.6 ± 3.04	1.21 ± 0.12	6.00 ± 1.15	22.4 ± 2.08	22.9
75-100 μm	100 psi	10.3 ± 0.30	0.46 ± 0.14	7.33 ± 2.40	6.02 ± 1.37	2.43
3.0 mg MS/rat	200 psi	14.8 ± 1.81	1.39 ± 0.14	7.33 ± 2.91	29.0 ± 2.76	11.4
(666 μg IDM/rat)	300 psi	20.1 ± 1.73	1.97 ± 0.16	2.67 ± 0.67	38.8 ± 3.75	14.7

$$*F_{0-24h} : [(AUC_{\text{bombard } 0-24h} / \text{Dose}_{\text{bombard}}) / (AUC_{i.c. 0-24h} / \text{Dose}_{i.c.})] \times 100$$

第3節 IDM 血中濃度推移に対する複数回投与の影響

Helios™ gun system を用いて IDM 含有 PLA MS を投与した後の IDM 血中濃度、 C_{max} 及び F_{0-24h} を改善するために、前章において IDM 皮膚内導入率及び導入量のいずれの増加を示した粒子径 75-100 μm の IDM 含有 PLA MS 1.0 mg を異なる部位に複数回投与したときの効果について調べた⁵³⁾。

Fig. 15 に Helios™ gun system を用いて、粒子径 75-100 μm の IDM 含有 PLA MS を種々条件下で投与した後の IDM 血中濃度推移を、Table 9 にその結果から得られた薬動的パラメータ及び IDM 皮膚内導入率を示す。粒子径 75-100 μm の IDM 含有 PLA MS 1.0 mg をヘリウム圧 300 psi でヘアレスラット腹部皮膚の異なる3箇所1回ずつ投与した後の IDM 血中濃度は、IDM 含有 PLA MS 3.0 mg を1箇所1回投与した後の IDM 血中濃度よりも有意に高い値を示した (Student's *t*-test, $P < 0.01$)。IDM

含有 PLA MS 1.0 mg を3回投与した後の F_{0-24h} は IDM 含有 PLA MS 1.0 mg を1回投与した後の F_{0-24h} とほぼ同等であったが、 AUC_{0-24h} は約 2.6 倍増加した。そして、IDM 含有 PLA MS 1.0 mg を3回投与した後の AUC_{0-24h} 及び F_{0-24h} は、IDM 含有 PLA MS 3.0 mg を1回投与した後のそれらよりも約 1.5 倍高い値を示した。さらに、これらの傾向は IDM 皮膚内導入率に相関した。以上の結果は、粒子径の大きな微粒子を、より少量の投与量で、高いヘリウム圧を用いて異なる部位に

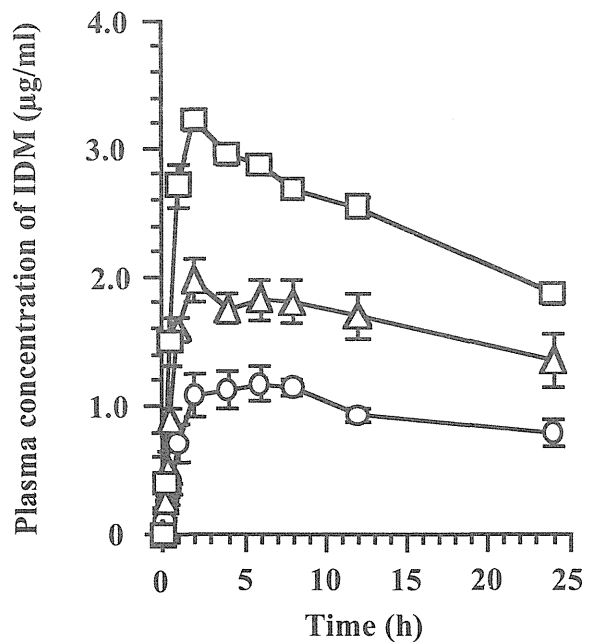


Fig. 15 Plasma concentration of IDM after bombardment of IDM-loaded PLA MS using the Helios™ gun system at various conditions
Particle size range ; 75-100 μm , Helium pressure ; 300 psi
Particle bombardment - O ; 1.0 mg MS in bolus, Δ ; 3.0 mg MS in bolus, □ ; 1.0 mg MS x 3 times
Each data point represents the mean and the standard error (n = 3-6).

複数回投与することで、より効果的に皮膚内に導入でき、結果的に高い F_{0-24h} 、吸収量及び高い血中濃度推移を達成できることを示している。従って、異なる部位への複数回投与は、用量が多い薬物においても応用できる可能性が示唆された。

Table 9 Percentage introduction and pharmacokinetic parameters of IDM after bombardment of IDM-loaded PLA MS using the Helios™ gun system at various conditions

	% introduction	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	T_{max} (h)	AUC_{0-24h} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)	F_{0-24h}^* (%)
<i>i.c.</i> (100 μg IDM/kg)	—	1.42 ± 0.05	0.17 ± 0.00	10.2 ± 0.38	—
1.0 mg MS in bolus (111 μg IDM/rat)	39.6 ± 3.04	1.21 ± 0.12	6.00 ± 1.15	22.4 ± 2.08	22.9
3.0 mg MS in bolus (666 μg IDM/rat)	20.1 ± 1.73	1.97 ± 0.16	2.67 ± 0.67	38.8 ± 3.75	14.7
1.0 mg MS x 3 times (666 μg IDM/rat)	38.4 ± 6.22	3.22 ± 0.24	2.00 ± 0.00	$58.9 \pm 4.10^{**}$	20.1

Particle size range ; 75-100 μm , Helium pressure ; 300 psi

* F_{0-24h} ; [($AUC_{\text{bombard } 0-24h} / \text{Dose}_{\text{bombard}}$) / ($AUC_{i.c. 0-24h} / \text{Dose}_{i.c.}$)] x 100

** Significant differences, $P < 0.01$ compared with 3.0 mg MS in bolus for AUC_{0-24h} .

第 4 節 本章の考察

本章では Helios™ gun system を用いた particle bombardment system が薬物の局所送達のみならず、全身送達においても応用可能であるどうかを検討し、また、このシステムを用いることにより、効果的に全身送達させることのできる導入条件を設定するために、血中濃度及び薬動学的パラメータに対するヘリウム圧、粒子径及び投与量の影響を検討した。その結果、particle bombardment system により皮膚内に導入された IDM 含有 PLA MS から IDM が全身送達されることが明らかとなった。つまり、Helios™ gun system を用いた particle bombardment system が薬物の局所送達のみならず、全身送達においても十分応用可能であることが明らかとなった。また、IDM 血中濃度及び F_{0-24h} の増加は IDM 含有 PLA MS の粒子径及び、特にヘリウム圧に依存した。 F_{0-24h} は投与量の減少によってさらに増加し、効果的に IDM を全身送達できた。しかしながら、血中濃度及び AUC_{0-24h} は投与量の減少に伴い減少した。そこで粒子径の大きな微粒子を用い、1 回の投与量をなるべく少量にして異なる部位に複数回投与すると、効率的に IDM 含有 PLA MS が皮膚内に導入され、しかも高い F_{0-24h} 、 C_{max} 、及び AUC_{0-24h} が得られた。さらに前章の結果から皮膚への障害も低いことが示されている。よって、particle bombardment system において、高いヘリウム圧を用い粒子径の大きな微粒子を少ない投与量で単回及び異なる部位に複数回投与することが、用量の異なる様々な薬物を効率的でかつ安全に皮膚内導入及び全身送達できる方法であると考えられた。

以上、第 2 章及び 3 章の結果から、Helios™ gun system を用いた薬物含有微粒子の particle bombardment system が種々の粉末薬物を皮膚及び全身循環系に送達するのに非常に有用な手段であることが示唆された。さらに、このシステムは皮膚角質層が薬物の透過バリアーとはならないため、用いる薬物の物性に関わらず皮膚内に導入できるので、皮膚吸収性の低い水溶性高分子薬物（ペプチド、蛋白性医薬品）の送達においても十分期待がもてる。また、マイクロスフィアから薬物の放出を制御することでその応用範囲は広がるものと考えられた。

第 4 章 粒子画像流速測定法 (PIV) による IDM 含有 PLA MS 皮膚内導入の解析

これまでに Helios™ gun system を用いることにより、IDM 含有 PLA MS を皮膚内に導入することができ、導入された IDM はその部位から全身送達されることが明らかとなった。また、IDM 皮膚内導入率及び F_{0-24h} はヘリウム圧、粒子径の増加及び投与量の減少により増加することを示した。Sarphie ら⁴⁷⁾と Yoshida ら⁵⁴⁾の報告によると、粒子の皮膚内導入 (深度) には粒子速度や粒子密度 (粒子質量) が深く関与するために、ヘリウム圧、粒子径及び投与量の変化はこれらに影響し、結果として粒子個々の運動エネルギーに影響していることが考えられる。

そこで、本章では近年、流体力学の空気流や水流の研究に広く用いられている Particle Image Velocimetry (PIV、粒子画像流速測定法)⁴⁶⁾を用いて、Helios™ gun system から噴射される IDM 含有 PLA MS の軌道を観察し、IDM 皮膚内導入率に影響を及ぼす要因について推測した。また、Helios™ gun system を用いて種々粒子径及び投与量の IDM 含有 PLA MS を種々ヘリウム圧で噴射したときの粒子速度を測定し、粒子速度に対するヘリウム圧、粒子径及び投与量の影響について検討した。また、粒子速度に加え、最も小さい IDM 含有 PLA MS (20-38 μm) の平均粒子径 (Table 2) から算出した質量を 1 としたときの相対質量比を算出し、IDM 皮膚内導入率及び F_{0-24h} に対するこれらパラメータの効果について調べた。

第 1 節 PIV の原理

PIV はまずある流場中 (空気流、水流等) に微細なトレーサ粒子 (ポリスチレン、アルミニウム、ガラス球) を加えて懸濁させ、流れの中の断面をレーザー光シートにより照明する (パルス間の時間間隔は平均流速及び画像の撮影倍率に依存する)。トレーサ粒子は 2 回の照明間に、局所流速に従って移動すると仮定される。トレーサ粒子からの散乱光を種々の記録媒体 (写真記録、

ビデオカメラ、CCD カメラ) により記録 (撮影) し、その画像は処理のため “調査領域” と呼ばれる小さな領域に分割され、2 照明間 (第 1 と第 2 の照明) によるトレーサ粒子像から局所変位ベクトルや粒子速度が各調査領域について求められる。調査領域内の全ての粒子は、2 回の照射の間一様に動くものと仮定される。局所流速ベクトルの光シート面内成分、すなわち 2 成分速度ベクトルは、2 照明間の時間差と画像の倍率を考慮して求められる。このプロセスが、PIV 画像のすべての調査領域について繰返され、粒子軌道が観測できる^{46, 55)}。現在では、PIV は流体力学の空気流や水流の研究に広く用いられている⁵⁶⁾。

Helios™ gun system により噴射される IDM 含有 PLA MS の軌道の観測と速度の測定にはこの PIV を応用した。Fig. 16 に今回用いた粒子観測システムの模式図を示す。トレーサ粒子として、各粒子径の IDM 含有 PLA MS (0.5、1.0 及び 3.0 mg) を用いた。粒子の散乱光を撮影するカメラには 1 秒間に 40,500 コマの撮影が可能な高速度カメラ (FASTCAM-ultima-I², Photron co., Japan) を用い、記録媒体にはビデオを用いた。

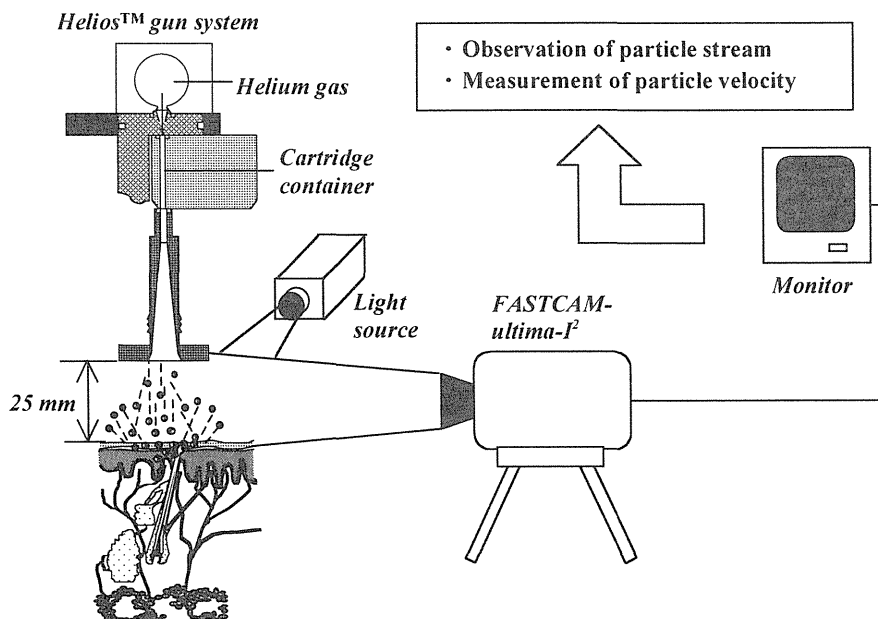


Fig. 16 Observation methods of particle stream

第2節 Helios™ gun system から噴射される粒子群の軌道に関する解析

第1項 Helios™ gun systemから噴射される粒子軌道の観察

Fig. 17に粒子径75-100 μm のIDM含有PLA MS 3.0 mgをヘリウム圧300 psiで噴射してから皮膚内に導入されるまでのデジタルハイスピードカメラによる粒子軌道の連続写真を示す。Helios™ gun systemを作動させると、その直後に高速の粒子群が噴射され皮膚に衝突した。その一方で、この集団よりも遅れて噴射される粒子群が観察された。この結果から、噴射直後の高速の粒子群の量が皮膚内導入率に影響を及ぼしていると考えられた。その後の遅れて噴射される粒子は、速度が減少していることが考えられ、皮膚内に導入されない可能性が高いと考えられる。また、噴射するIDM含有PLA MS投与量を減少させることにより、この遅れて噴射される粒子は少なくなる傾向が認められたことから、このことが投与量の減少によるIDM皮膚内導入率を増加させた要因の一つと考えられる。

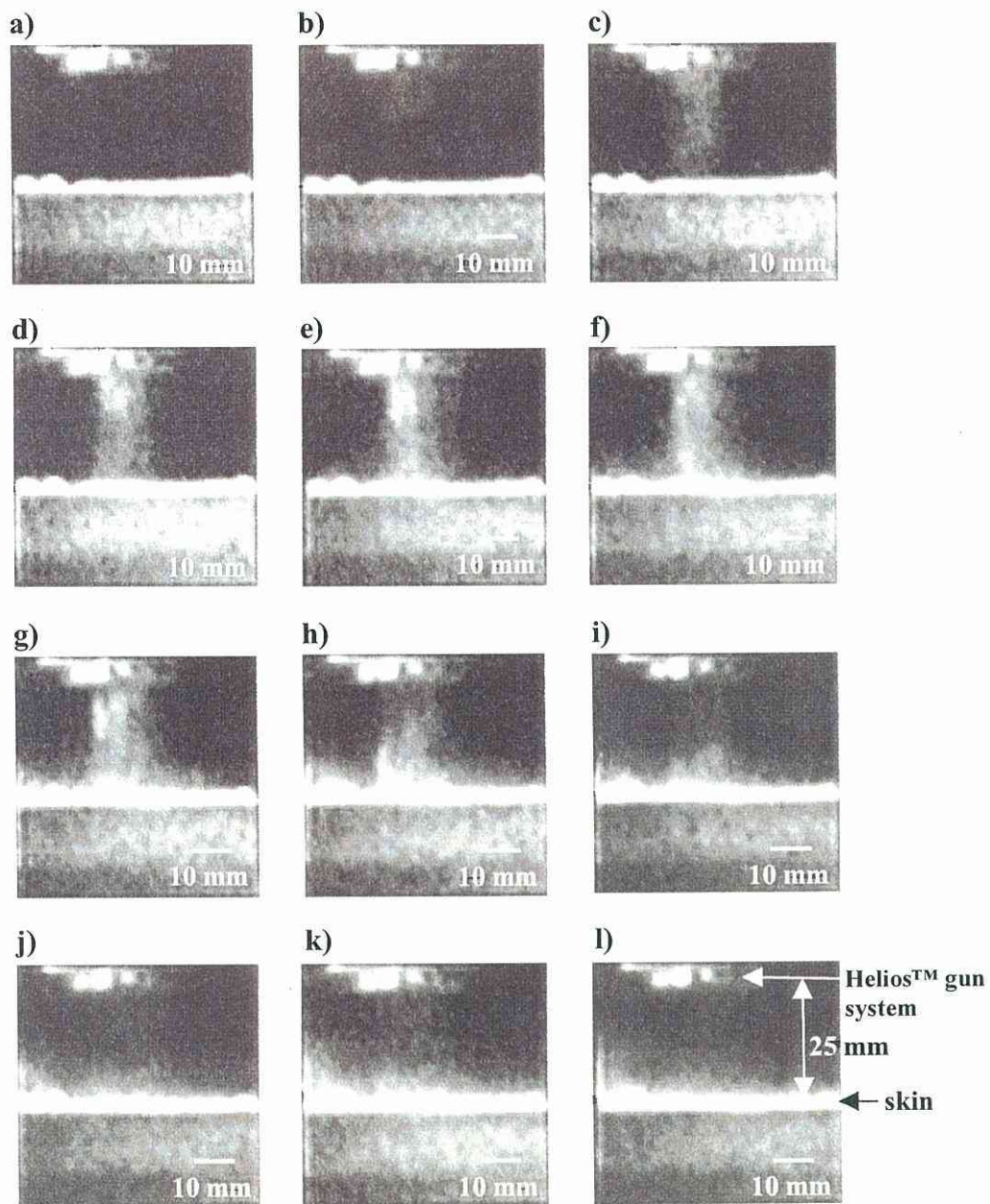


Fig. 17 Ultra high-speed photographs of microparticles after bombardment by the Helios™ gun system

Particle size range ; 75-100 μm , Bombardment dose ; 3.0 mg, Helium pressure ; 300 psi

After bombardment ; a) 0 μs , b) 50 μs , c) 99 μs , d) 223 μs , e) 346 μs , f) 470 μs , g) 593 μs , h) 717 μs , i) 766 μs , j) 889 μs , k) 939 μs , l) 1087 μs

第2項 Helios™ gun systemから噴射される粒子軌道のベクトル解析

次に、作動直後に噴射される粒子の軌道について、ベクトル解析を行った。Fig. 18にHelios™ gun systemを用いて粒子径75-100 μm のIDM含有PLA MS 3.0 mgをヘリウム圧300 psiで噴射したときのIDM含有PLA MSの軌道をベクトル表示した結果を示す。皮膚が存在しないとき (Fig. 18a)、Helios™ gun systemから噴射されたIDM含有PLA MSは直進するヘリウムガスに乗って瞬時に最高速度に到達し、その速度を維持したままほぼ一直線に進行することが明らかとなった。この結果は破裂膜を装着した新規カートリッジコンテナを装備したHelios™ gun systemが遺伝子導入用のときと同様に正しく機能していることを示唆している。

また、皮膚に向かって噴射したとき (Fig. 18b)、噴射された粒子が皮膚表面に向かって進行し、皮膚に衝突すると同時に、粒子が皮膚表面上で跳ね返されるというベクトルが得られた。この結果から粒子の皮膚内導入に関して、皮膚側にも何らかの要因（皮膚密度、動粘性率等）が存在すると考えられた。

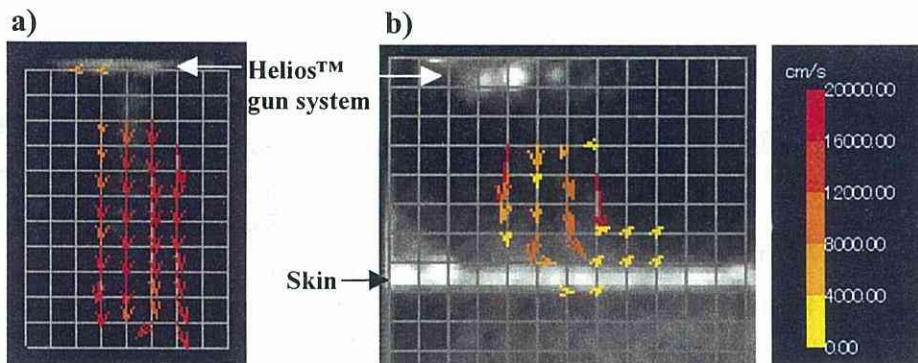


Fig. 18 Typical velocity fields of IDM-loaded PLA MS bombarded by the Helios™ gun system

a) absence of the skin, b) particle bombardment to the skin
Particle size range ; 75-100 μm , Bombardment dose ; 3.0 mg,
Helium pressure ; 300 psi

Yoshida らは Helios™ gun system を用いて半径 0.8 μm の金粒子を 1 % 寒天ゲルに噴射し、以下の式で金粒子の導入深度を理論的に計算している⁵⁴⁾。

$$f = \frac{1}{2} \rho S v^2 + PS$$

$$= ma \quad \dots \dots \dots (1)$$

ここで、f は粒子の力、a は粒子加速度、m は粒子質量、S は粒子の断面積、v は粒子速度、ρは密度、P は寒天ゲルの最大応力 (10⁴ N/m²) を示す。式 (1) に標的物質のパラメータが加えられていることから、標的部位の物性も粒子の導入に影響し、皮膚に関するパラメータには皮膚の密度 (およそ 1) 及び動粘性率 (動粘度：水と仮定して 10⁻⁶ m²/sec) があると報告されている⁴⁴⁾。

さらに、皮膚内導入後の皮膚表面を走査型電子顕微鏡を用いて観察した。Fig. 19 に粒子径 75-100 μm の IDM 含有 PLA MS 3.0 mg をヘリウム圧 300 psi で投与した直後の皮膚表面の走査型電子顕微鏡写真を示す。この写真から明らかなように、角質層表面上に留まり埋没している粒子が観察された。その一方で、皮膚表面に小さな穴が観察された。これは粒子が角質層を貫通して皮膚内導入された形跡であると考えられた。

以上の結果から、Helios™ gun system を用いてIDM含有PLA MSを投与すると高速に加速された粒子は皮膚内に導入されるが、その一部は跳ね返されて皮膚内に導入されないか、又は角質層表面上に留まることが推察された。

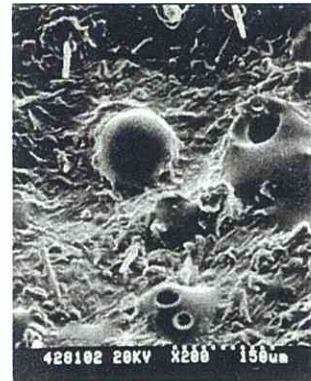


Fig. 19 Scanning electron microphotographs of hairless rat abdominal skin after bombardment of IDM-loaded PLA MS to the skin using the Helios™ gun system
 Particle size range : 75-100 μm,
 Bombardment dose : 3.0 mg,
 Helium pressure : 300 psi

第3節 薬物含有微粒子の皮膚内導入に関与する因子の解析

次に、PIVを用いて皮膚が存在しないときに噴射した先端の高速粒子群画像からIDM含有PLA MSの速度を算出し（なお、このときの粒子速度は皮膚が存在する付近の粒子速度で表示した）、粒子速度に対するヘリウム圧及びIDM含有PLA MSの粒子径及び投与量の影響について検討した。また、その条件下における粒子速度とIDM皮膚内導入率及び F_{0-24h} との関係から粒子運動エネルギーに及ぼす要因について検討した。

第1項 粒子速度に対するヘリウム圧の影響

まず最初に、粒子速度に対するヘリウム圧の影響について検討した。Fig. 20に粒子径75-100 μm のIDM含有PLA MS 1.0 mgをHelios™ gun systemを用いて種々ヘリウム圧で投与したときの粒子速度に対するヘリウム圧の影響を、Fig. 21に粒子速度とIDM皮膚内導入率及び F_{0-24h} との関係を示す。粒子径75-100 μm のIDM含有PLA MS 1.0 mgをHelios™ gun systemを用いて投与すると、ヘリウム圧に依存して粒子速度は直線的に増加し、IDM皮膚内導入率及び F_{0-24h} も粒子速度に依存して増加した。これらの結果から、ヘリウム圧を高くすると噴射される粒子の速度が増大し、そのことが個々の粒子の運動エネルギーを高めた結果、IDM皮膚内導入率及び F_{0-24h} は大きくなったと考えられた。

Fig. 21に示したように、皮膚内導入率は F_{0-24h} に比べ粒子速度依存性が低かった。これは、この解析に深さ方向（導入深度）の情報が与えられていないことによると考えられる。第1章のFig. 4に示したように、ヘリウム圧の増加は、より深い皮膚組織への導入と導入量をもたらす。すなわち、低いヘリウム圧では、皮膚内に導入されても有効に利用されない、つまり有効に利用される深度に達していないIDM含有PLA MSが存在すると考えられた。よって、全身送達性に関し、有効に利用されたIDM量を示す F_{0-24h} の方が、粒子速度の影響をより反映したものと考えられた。

Sarphie らは momentum density の概念を用いて微粒子の導入深度を解析しており、粒子の導入深度は粒子密度、粒子径及び粒子速度と関係すると述べている⁴⁷⁾。つまり、次式で示される。

$$D_p \sim M_D = v_p m_p / A_p \quad \dots \dots \dots (2)$$

$$D_p \sim v_p d_p r_p \quad \dots \dots \dots (3)$$

ここで、 D_p は粒子導入深度、 M_D は momentum density、 v_p は粒子速度、 m_p は粒子質量、 A_p は粒子の衝突の面積、 d_p は粒子径、 r_p は粒子密度を示す。この概念によると、粒子導入深度は粒子速度、粒子径及び粒子密度に比例する。従って、この場合粒子に関するパラメータは等しいことから、ヘリウム圧の増加で導入率及び F_{0-24h} が大きくなったのは、Helios™ gun system からの噴射される粒子の粒子速度 v_p が大きくなったためと考えられ、粒子速度の結果と一致した。

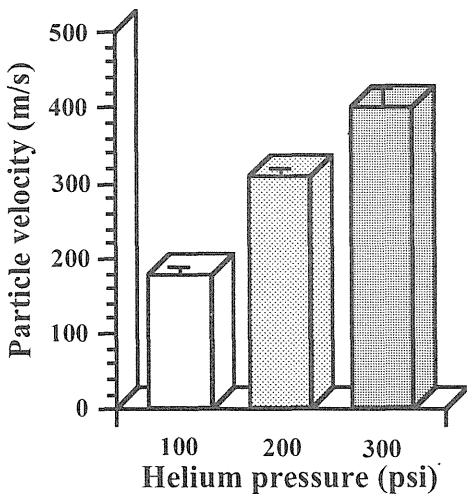


Fig. 20 Effect of helium pressure on particle velocity
 Particle size range ; 75-100 μ m,
 Bombardment dose ; 1.0 mg
 Each data point represents the mean and standard error (n= 3).

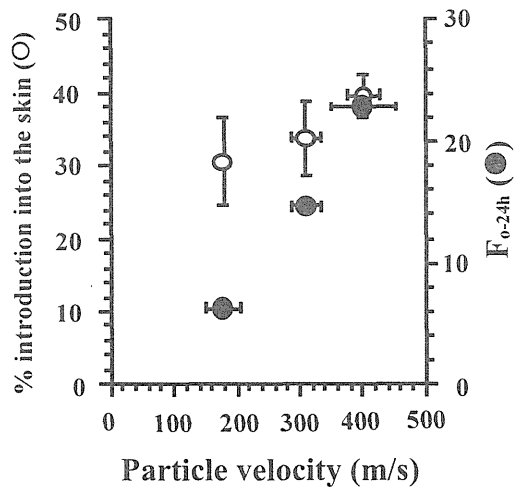


Fig. 21 Relationship between particle velocity and % introduction, F_{0-24h} of IDM
 Particle size range ; 75-100 μ m,
 Bombardment dose ; 1.0 mg
 Each data point represents the mean and standard error (n= 3-4).

第2項 粒子速度に対する微粒子の粒子径の影響

次に、粒子速度に対する微粒子の粒子径の影響について検討した。Fig. 22に種々粒子径（20-38、44-53及び75-100 μm ）のIDM含有PLA MSを投与量1.0 mg、ヘリウム圧300 psiで噴射したときの粒子速度に対する微粒子の粒子径の影響を、Fig. 23にその粒子速度とそのときのIDM皮膚内導入率及び F_{0-24h} との関係を示す。いずれの粒子径のIDM含有PLA MSを噴射したときの粒子速度もほとんど変わらなかった（約400 m/s）。このときのIDM皮膚内導入率及び F_{0-24h} は粒子径20-38及び44-53 μm ではあまり変わらなかったものの粒子径75-100 μm では高かった。これは先のヘリウム圧のときとは異なり、粒子速度がほぼ等しいにも関わらず特に大きな粒子径でIDM皮膚内導入率及び F_{0-24h} が高くなったのは、粒子速度以外の皮膚衝突時の微粒子個々の運動エネルギーを大きくすると考えられる粒子の質量の増加が関係していると考えられた（式（1）、（2）及び（3））。また、導入率の方が F_{0-24h} よりも粒子径の影響を受けなかったのは、前項と同様に粒子径の違いによる深さ方向への効果が結果に現われていないことによると推察された。

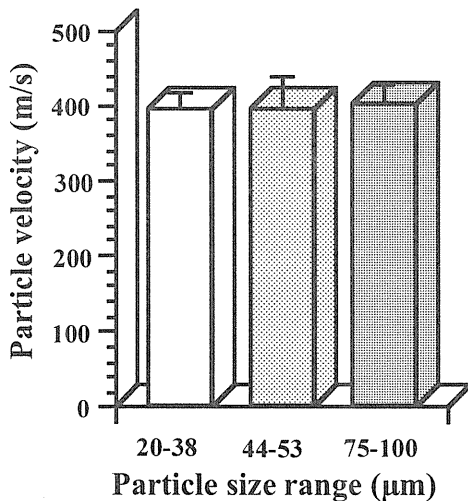


Fig. 22 Effect of particle size on particle velocity

Helium pressure ; 300 psi,
Bombardment dose ; 1.0 mg
Each data point represents the mean and standard error (n= 3).

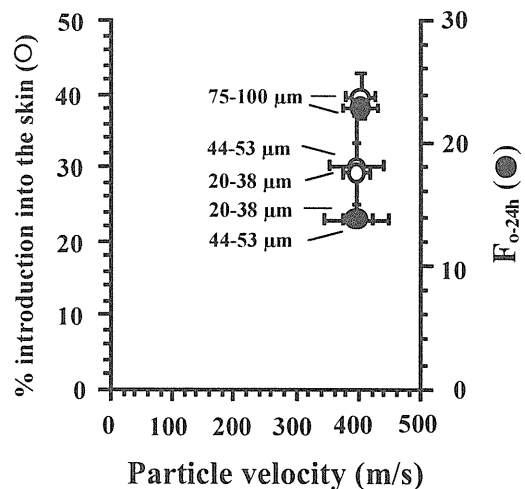


Fig. 23 Relationship between particle velocity and % introduction, F_{0-24h} of IDM

Helium pressure ; 300 psi,
Bombardment dose ; 1.0 mg
Each data point represents the mean and standard error (n= 3-5).

第3項 粒子速度に対する微粒子の投与量の影響

次に、粒子速度に対する微粒子の投与量の影響について検討した。Fig. 24に粒子径75-100 μm のIDM含有PLA MS (0.5, 1.0及び3.0 mg)をヘリウム圧300 psiで噴射したときの粒子速度に対する投与量の影響を、Fig. 25にその粒子速度とそのときのIDM皮膚内導入率及び F_{0-24h} との関係を示す。IDM含有PLA MSの投与量を増加するとそれに伴い粒子速度は減少した。また、IDM皮膚内導入率及び F_{0-24h} も粒子速度に依存した。投与量は、粒子速度に影響しないと考えられるが(式(1)、(2)及び(3))、本結果は投与量によって影響を受けた。それは導入率及び F_{0-24h} にも反映された。ここに示した粒子速度はHeliosTM gun systemの作動直後に最も速く噴射される粒子群の速度であるので、投与量の増加に伴う導入率及び F_{0-24h} の減少は、先の高速粒子の観察結果から得られた投与量の増加で遅れて噴射される速度の遅い微粒子の増加からだけでは説明できない。推察として噴射直後の微粒子同士の衝突等の確率が増したことによる粒子速度の減少に加え、HeliosTM gun systemのカートリッジコンテナ

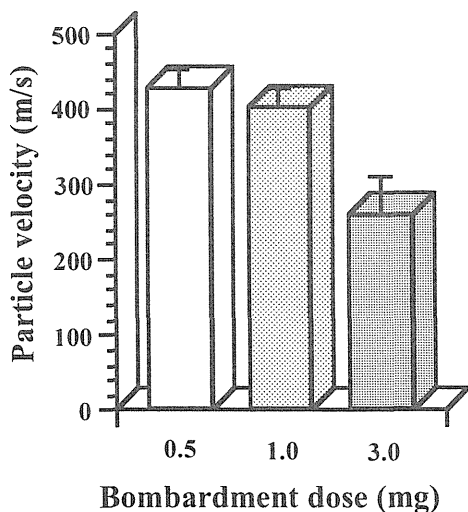


Fig. 24 Effect of bombardment dose on particle velocity

Particle size range ; 75-100 μm ,
Helium pressure ; 300 psi
Each data point represents the mean and standard error (n= 3).

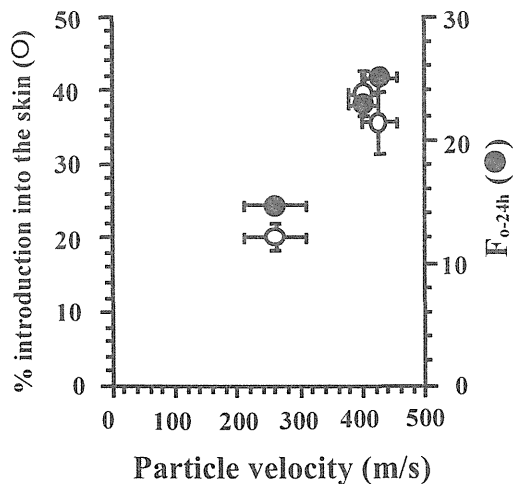


Fig. 25 Relationship between particle velocity and % introduction, F_{0-24h} of IDM

Particle size range ; 75-100 μm ,
Helium pressure ; 300 psi
Each data point represents the mean and standard error (n= 3-6).

に充填された量（投与量）が多くなったため、噴射口に近い粒子に対するヘリウムガスによる圧力の効果も減衰し、IDM皮膚内導入率及び F_{0-24h} の減少が起ったものと考えられる。

第4項 皮膚内導入率及び吸収率に対する粒子速度並びにPLA MSの 相対質量の影響

前項までの結果から、IDM含有PLA MSの皮膚内導入率及び吸収率に対して粒子速度並びに粒子の質量が影響することが示唆された。本項では、これらパラメータを評価し、Helios™ gun systemを用いたparticle bombardmentにどちらのパラメータが影響しているのかを調べた。前項までの結果を基に、粒子質量の効果を等しくするために、粒子径75-100 μm のIDM含有PLA MSの粒子速度とIDMの皮膚内導入率及び F_{0-24h} との関係を、また、粒子速度の影響を等しくするために、IDM含有PLA MSの粒子速度がほぼ400 m/sのときの粒子質量とIDMの皮膚内導入率及び F_{0-24h} との関係を調べた。なお、粒子質量は相対質量として評価した、すなわち、平均粒子径から算出した最も小さいPLA MS (20-38 μm)の質量を1としたときの値である。

Fig. 26にIDMの皮膚内導入率及び吸収率に対するIDM含有PLA MSの粒子速度の影響を、Fig. 27にIDM含有PLA MSの粒子相対質量の影響を示す。皮膚内導入率及び F_{0-24h} は粒子速度及び粒子相対質量比のいずれにも依存する傾向が認められた。特に F_{0-24h} と粒子速度及び粒子相対質量との間には良好な相関関係が認められた。これは先にも述べたように、 F_{0-24h} は有効に利用される深度まで到達した粒子だけが評価されていることによると考えられる。

皮膚内導入率及び吸収率に対する粒子速度の影響と粒子相対質量の影響を比較すると、粒子速度の方が粒子相対質量よりも明らかに影響を及ぼしていることがわかった。

以上、これまでの検討結果から、皮膚内導入率及び F_{0-24h} を決定している因

子は主に粒子速度であることが明らかとなった。

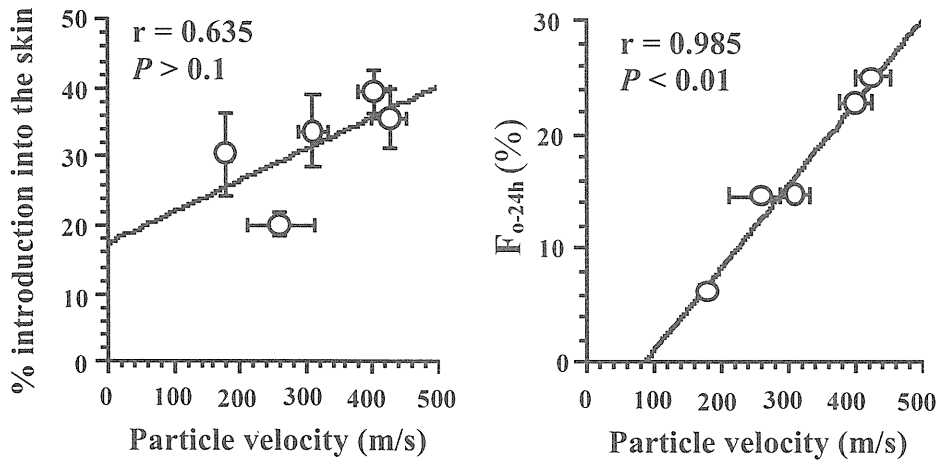


Fig. 26 Relationship between the particle velocity and % introduction into the skin, and F_{0-24h} of IDM

Particle size range ; 75-100 μm

Each data point represents the mean and standard error (n=3-6).

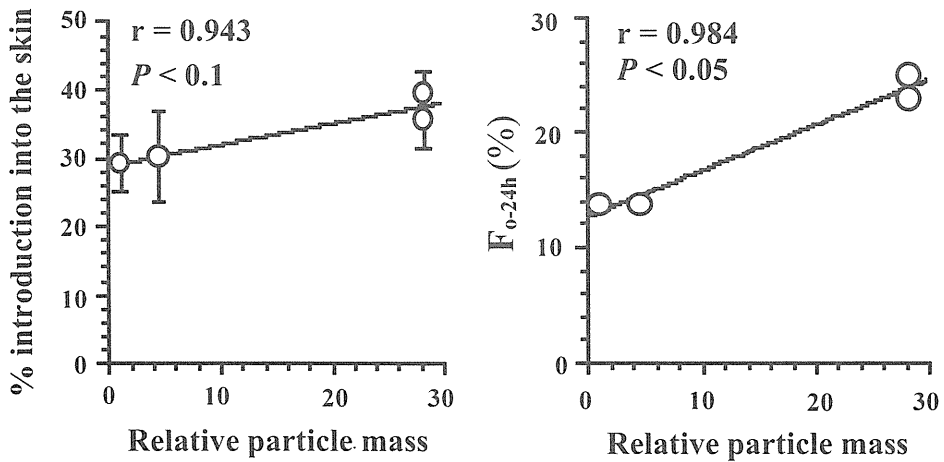


Fig. 27 Relationship between the relative particle mass and % introduction into the skin, and F_{0-24h} of IDM

Particle velocity ; about 400 m/s

Each data point represents the mean and standard error (n=3-5).

第4節 本章の考察

本章では PIV を用いて Helios™ gun system から噴射されて、皮膚内に導入されるまでの IDM 含有 PLA MS 群の軌道を観察した。その結果、Helios™ gun system から噴射された IDM 含有 PLA MS は瞬時に最高速度に到達し、その速度を維持したままほぼ一直線に進行した。また、Helios™ gun system から噴射される IDM 含有 PLA MS 群の軌道を詳細に観察したところ、噴射初期の高速な IDM 含有 PLA MS 群に続いて、それよりも遅れて噴射される IDM 含有 PLA MS 群が観察され、この IDM 含有 PLA MS 群は明らかに速度が減少していると予測された。さらに、IDM 含有 PLA MS の投与量の増加で遅れて噴射される IDM 含有 PLA MS 群が多く観察され、かつ投与量の増加で導入率が減少することから、この IDM 含有 PLA MS 群は皮膚内に導入されにくいと考えられた。そして、Helios™ gun system から噴射された IDM 含有 PLA MS 群が皮膚に衝突すると、その一部の IDM 含有 PLA MS 群は皮膚表面上で跳ね返されることが明らかとなったから、皮膚の物理化学的性質（粘弾性等）も導入率に影響すると思われた。

さらに、ヘリウム圧、粒子径及び投与量を変えたときの粒子速度及び粒子質量と、IDM 皮膚内導入率及び F_{0-24h} との関係について調べた結果、いずれのパラメータも皮膚内導入率及び F_{0-24h} に影響したが、主に粒子速度が決定因子であることが明らかとなった。加えて、前章で皮膚内導入率及び F_{0-24h} が IDM 含有 PLA MS の粒子径よりもヘリウム圧及び投与量依存性を示したのは、噴射される微粒子の粒子径は主に粒子質量に影響したのに対し、噴射の駆動力であるヘリウム圧及び噴射される微粒子の投与量は主に噴射される微粒子の粒子速度に影響し、個々の粒子の運動エネルギーに著しく影響を及ぼしたためと考えられた。

第 2 編 Particle bombardment system を用いた抗原含有微粒子 の免疫処置に関する検討

前編において、Helios™ gun system に破裂膜を装着した新規カートリッジコンテナを用いることで、薬物含有微粒子を皮膚内に導入することができ、微粒子に含有させた薬物を局所及び全身送達できることを示した。また、粒子を加速させるヘリウム圧や導入する微粒子の粒子径及び投与量を制御することで、より効率的でかつ安全性の高い薬物送達が可能であることが明らかとなった。このように、本システムは医薬品をその物性に関係なく、固体のまま皮膚内に導入できる。この最大の利点は、これまで注射以外の剤形ではほとんど成功例のない、極微量で効果が得られる水溶性高分子のペプチドや蛋白性医薬品、さらにはワクチンを用いた注射以外の治療を現実のものとする可能性を秘めている⁴⁷⁾。

免疫療法、特にワクチン接種においては生体防御反応が投与量の依存性を受け難いことが考えられ、このシステムでの投与に適していると考えられた。さらに、幾つかの研究グループが、抗原を封入した微粒子を種々投与ルートで投与すると、抗原水溶液で投与したときよりも有意に高い免疫応答を示し³³⁻³⁵⁾、微粒子とすることでアジュバント効果が得られ、単回投与が可能となるばかりでなく抗原の局在化や低用量の抗原投与で免疫を可能にすることを報告している³⁶⁻³⁸⁾。その上、皮膚は体内で最も外気に曝されている器官であり、皮膚には免疫反応を開始するのに必要不可欠な抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞（一般に表皮に存在）をはじめとする樹状細胞（一部真皮にも存在）が存在し³⁹⁻⁴¹⁾、このシステムでの投与法は投与部位である皮膚が免疫学的に活発な組織になると報告されている^{42, 43)}。

このシステムでの免疫処置を想定した場合、表皮に存在するランゲルハンス細胞や樹状細胞等の抗原提示細胞（antigen presenting cell, APC）が皮膚に侵入した抗原を取り込み、処理して主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex, MHC）と共に細胞表面上に抗原ペプチドを表出すると、この APC は所属リンパ節に移動する。所属リンパ節に移動した APC

が T 細胞レセプター (T cell receptor, TCR) を介してナイーブ T 細胞に抗原ペプチドを提示すると、ナイーブ T 細胞は活性化され、増殖して感作 T 細胞となり、一連の免疫応答が誘導されることが考えられる (Fig. 28) ⁵⁷⁾。

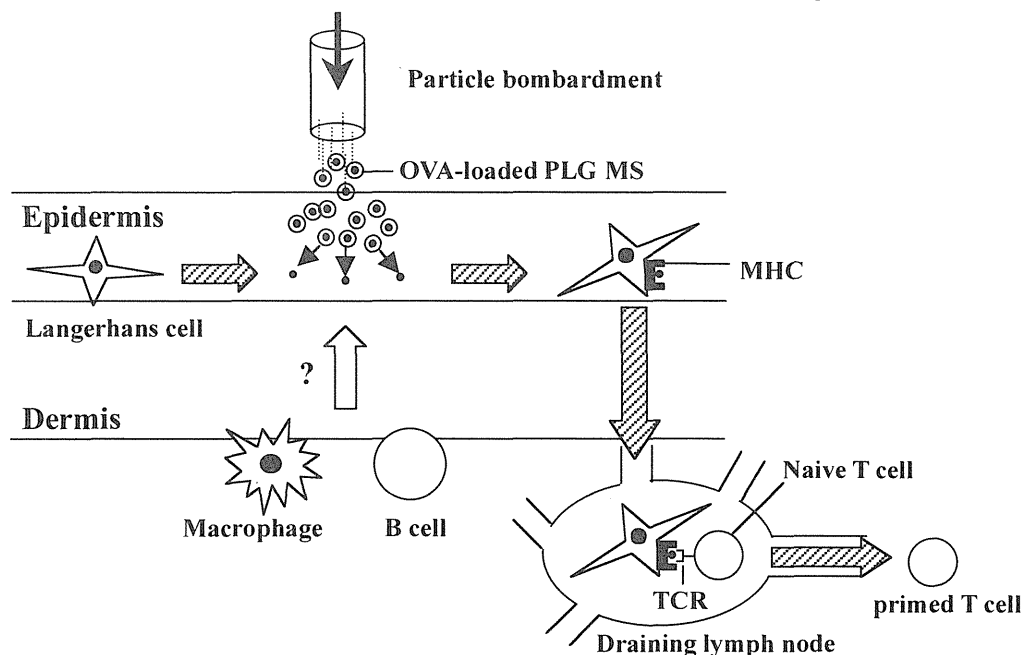


Fig. 28 Antigen presentation after bombardment of OVA-loaded PLG MS using Helios™ gun system

以上のことから、particle bombardment system がワクチン接種において適した投与方法であり、この装置である Helios™ gun system は回転式のホルダーを所有することから発展途上国での集団接種や家畜へのワクチン接種も可能であると考えられた。また、従来の注射筒、注射針を用いる免疫処置（皮下及び筋肉内注射）によって生じる、血液を介する新たな病原菌への感染、医療廃棄物の増大、投与時の痛み等によるコンプライアンスの低下といった問題 ⁵⁸⁻⁶⁰⁾を解決することが期待される。

そこで本編では、モデル抗原にニワトリ卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) を、マイクロスフィアの壁材料にポリ乳酸グリコール酸共重合体 (poly(DL-lactide-co-glycolide), PLG (50 : 50, M.W. 40,000-75,000)) を選択して、粒子径 75-100 μm の OVA 含有 PLG マイクロスフィア (MS) を調製し、particle

bombardment system を用いた抗原含有微粒子の皮膚内導入が、ワクチン接種に応用できるかどうかを検討した。また、このシステムを用いることにより誘導される免疫応答性について検討した。本編では前編で最も効果が高かった粒子径 75-100 μm の OVA 含有 PLG MS を用いた。

第 1 章 OVA 含有 PLG MS の皮膚内導入に関する検討

Helios™ gun system を用いて OVA 含有 PLG MS をマウスに免疫処置する前に、OVA の放出を制御する目的でマイクロスフィアの壁材料を変更したことや実験動物をラットからマウスに変更したことから、調製した OVA 含有 PLG MS が Helios™ gun system によりマウス腹部皮膚内に導入されるかどうかを確認した。そこで、FITC で標識した OVA 含有 PLG MS を調製して視覚的に確認するとともに、皮膚内に導入される OVA 含有 PLG MS 量を見積るために、ローダミン B を含有した OVA 含有 PLG MS を調製し、ローダミン B をマーカー物質として皮膚内導入率を算出した。

第 1 節 OVA 含有 PLG MS の調製及び特性

OVA 含有 PLG MS は Chart 2 で示したように、w/o/w emulsion/solvent evaporation method にて調製した^{61, 62)}。得られた PLG MS をステンレス製のふるいを用いて粒子径 75-100 μm の OVA 含有 PLG MS に分級した。PLG MS 中の OVA 含有率は 6.3 % であり、封入効率はおよそ 69 % であった。

Fig. 29 に調製した粒子径 75-100 μm の OVA 含有 PLG MS の走査型電子顕微鏡写真を示す。OVA 含有 PLG MS の形態は球形であり、その表面構造は非常に滑らかであった (Fig. 29a)。しかし、OVA 含有 PLG MS の内部構造には無数の空隙が認められた (Fig. 29b)。これは OVA 含有 PLG MS を調製するのに w/o/w エマルジョンから溶媒を蒸発させて固化するため、その際に生じるジ

クロロメタンと水との蒸発速度の差がこのような空隙を形成したものと考えられた。このような空隙は個々のPLG MSの重量を減少させるため、皮膚内導入率を減少させることが考えられた。

Fig. 30に粒子径75-100 μm のOVA含有PLG MSからのin vitro OVA放出プロファイルを示す。実験開始24時間までに含有量の約10%が初期バーストにより放出され、その後6週目まで、非常にゆっくりとOVAが放出された。さらに6週目以降、PLG MSの崩壊に伴う速い放出が観察され、3相性を示した。

この抗原放出パターンはワクチンの接種計画に類似していたため、単回投与において追加免疫処置効果が得られることが期待された。

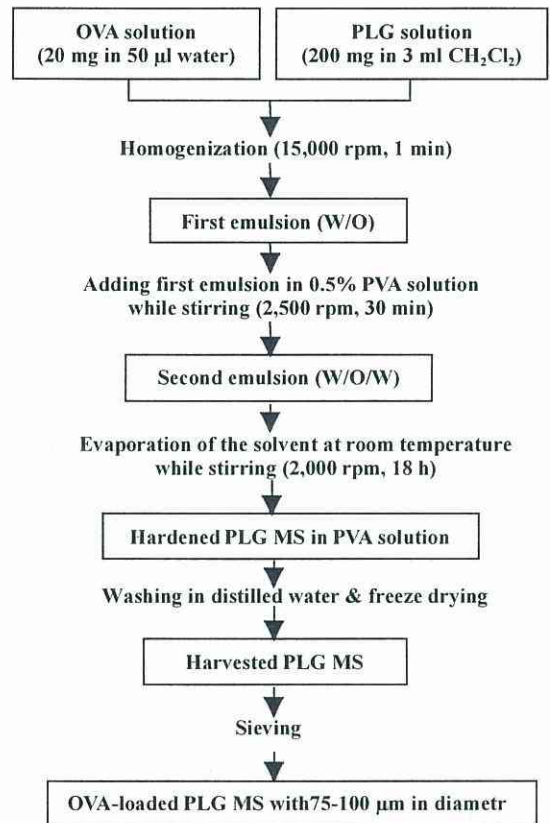


Chart 2 Preparation of OVA-loaded PLG MS

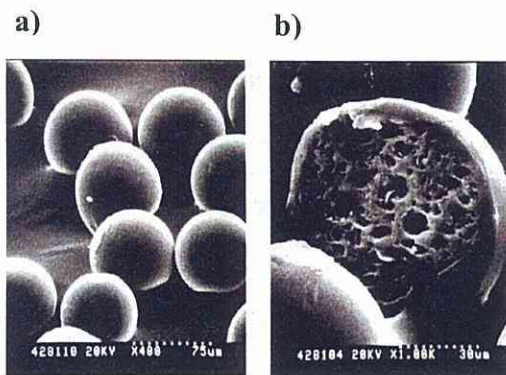


Fig. 29 Scanning electron microphotographs of OVA-loaded PLG MS with 75-100 μm in diameter
a) Surface, b) Internal structure

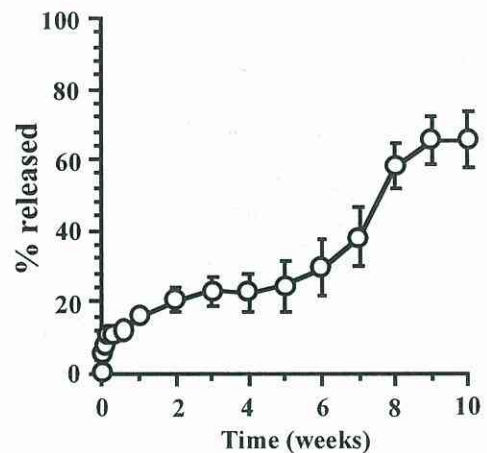


Fig. 30 In vitro OVA release from PLG MS with 75-100 μm in diameter

第2節 組織学的検討

Helios™ gun systemを用いてOVA含有PLG MSで免疫処置する前に、OVA含有PLG MSがHelios™ gun systemにより皮膚内に導入されるかどうかを共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて定性的に評価した。導入用粒子はFITCで標識したOVAを含有するPLG MSをChart 2の方法に従って調製し、ステンレス製ふるいを用いて粒子径75-100 μm のFITC標識OVA含有PLG MSを分級して用いた。

Fig. 31に粒子径75-100 μm のFITC標識OVA含有PLG MS 1.0 mgを除毛したマウス腹部皮膚にヘリウム圧100、200及び300 psiで投与した直後の共焦点レーザー蛍光顕微鏡による皮膚断面写真を示す。ヘリウム圧100 psiで投与したとき、FITC標識OVA含有PLG MSは皮膚表面上に付着しており、皮膚内にほとんど導入されることが明らかとなった。ヘリウム圧を200及び300 psiで投与すると、FITC標識OVA含有PLG MSは皮膚内に観察された。また、ヘリウム圧を高くするにつれてFITC標識OVA含有PLG MSは皮膚の深部（表皮から真皮へ）へシフトし、その数も増加した。これらの結果より、高いヘリウム圧で粒子径75-100 μm のFITC標識OVA含有PLG MS 1.0 mgをマウス腹部皮膚に投与しても、前編のIDM含有PLA MSをラットに投与したときと同様に皮膚の深部に導入されることが定性的に明らかとなった。

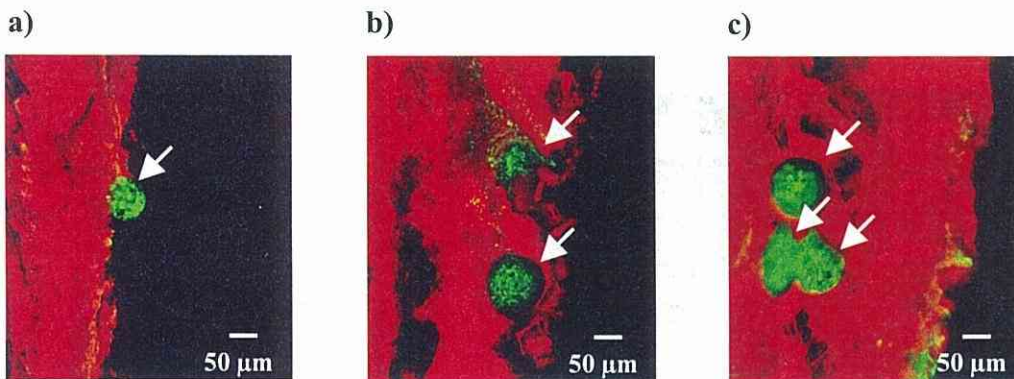


Fig. 31 Confocal laser microphotographs of the cross-section of mouse abdominal skin after bombardment of PLG MS containing FITC-labeled OVA with 75-100 μm in diameter at different pressures using the Helios™ gun system

Helium pressure ; a) 100 psi, b) 200 psi, c) 300 psi

Arrows indicate PLG MS containing FITC-labeled OVA with 75-100 μm in diameter

第3節 皮膚内導入率に関する検討

次にHelios™ gun systemにより皮膚内に導入されるOVA含有PLG MS量を、マーカー物質にローダミンBを選択して、Chart 2の方法に準じて調製した粒子径75-100 μm のローダミンBを含有したOVA含有PLG MSをHelios™ gun systemを用いて投与したときの導入率を調べた。なお、ローダミンBの含有率は0.17%と低く、OVA含有PLG MSの物性に影響を与えないと考えられた。データは第1編と同様に、投与量に対する割合、つまり、皮膚内導入率として評価した。

Fig. 32に粒子径75-100 μm のOVA及びローダミンB含有PLG MS 1.0 mgをHelios™ gun systemを用いてヘリウム圧100、200及び300 psiでマウス腹部皮膚に投与した後のOVA含有PLG MSの皮膚内導入率を示す。OVA含有PLG MSの皮膚内導入率はヘリウム圧に依存して増加し、ヘリウム圧100 psiのときの皮膚内導入率は約5%であったが、ヘリウム圧300 psiのときの皮膚

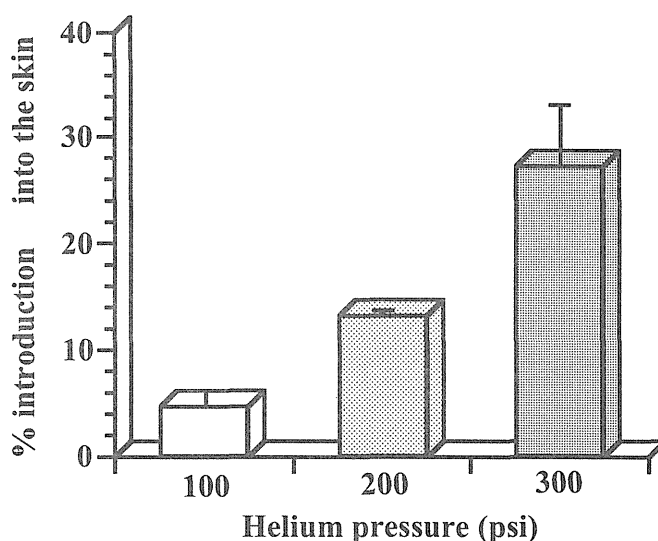


Fig. 32 Effect of helium pressure on % introduction of PLG MS in the skin after bombardment of OVA and rhodamine B-loaded PLG MS
Each data column represents the mean and standard error (n=3).

内導入率は約27%であった。しかしながら、OVA含有PLG MSの皮膚内導入率は第1編—第2章での粒子径75-100 μm のIDM含有PLA MS 1.0 mgを種々ヘリウム圧で投与した後の皮膚内導入率よりも若干低い値を示した。これは投与した動物による種差が認められなかったことから (data not shown)、マイクロスフィアの壁材料の変更もしくは、Fig. 29bで示したようにOVA含有PLG MSの調製時に形成されるPLG MS内部の空隙がOVA含有PLG MSの皮膚内導入率を減少させたものと考えられた。これらの結果より、IDM含有PLA MSをラット

に投与したときより、導入性が若干落ちるものの、ヘリウム圧300 psiで粒子径75-100 μm のOVA含有PLA MSをマウスに投与すると、定量的にも皮膚内に導入されることが明らかとなった。

第4節 本章の考察

本章では、Helios™ gun systemを用いて、モデル抗原として用いたOVAを含有するPLG MSをマウス腹部皮膚内に導入できるかどうかを定性的並びに定量的に確認した。その結果、Helios™ gun systemにより粒子径75-100 μm のOVA含有PLG MSが皮膚内に導入されることが明らかとなった。その皮膚内導入率はIDM含有PLA MSと比較して若干低い値を示したものの、ヘリウム圧300 psiでは約30%導入された。

以上の結果より、Helios™ gun systemを用いてOVA含有PLG MSをマウス腹部皮膚内に導入する免疫処置法により、免疫応答が賦活化されると考えられた。

第2章 Particle bombardment system を用いた免疫処置に関する検討

前章において、粒子径75-100 μm のOVA含有PLG MSがparticle bombardment systemによりマウス腹部皮膚内に導入されることが明らかとなった。そこで本章では、粒子径75-100 μm のOVA含有PLG MSを、Helios™ gun systemを用いて皮膚内に導入することで、免疫応答が賦活化されるかどうかを検討した。また、このシステムを用いることにより誘導される免疫応答性についても検討した。

第1節 Particle bombardment systemを用いた免疫処置による抗体応答

本節では、Helios™ gun systemを用いてOVA含有PLG MSをマウスに投与した後の血清中の抗OVA IgG抗体力価を測定することにより、このシステムを用いた免疫処置により抗体応答の誘導が可能かどうかを検討した。前編の皮膚内導入率及び全身送達に関する検討結果から、OVA含有PLG MSの粒子径は75-100 μm 、マイクロスフィア投与量は1.0 mg/マウス (63 μg OVA/mouse) を選択し、ヘリウム圧は100、200及び300 psiに設定した。また、コントロールとして従来ワクチン接種法であるOVA生理食塩液の皮下注射群 (63 μg OVA/0.2 ml/mouse)、ポジティブコントロールとしてヒトでの使用が認可されていない強力なアジュバントであるFreund's complete adjuvant (FCA) をOVA生理食塩液と乳化して皮下注射した群 (FCA処置群) で免疫処置実験を行った。Particle bombardment との比較として、Helios™ gun systemを用いた免疫処置と同様の粒子径75-100 μm のOVA含有PLG MSの懸濁液を皮下注射した群 (1.0 mg MS/0.2 ml/mouse) 及び何も免疫処置していない無処置群を設けた。

Fig. 33aに種々のOVA製剤をマウス背部皮下に注射した後の抗OVA IgG抗体力価の時間プロファイルを、Fig. 33bにHelios™ gun systemを用いて粒子径75-100 μm のOVA含有PLG MS 1.0 mgをヘリウム圧100、200及び300 psiでマウス腹部皮膚に投与した後の抗OVA IgG抗体力価の時間プロファイルを示す。

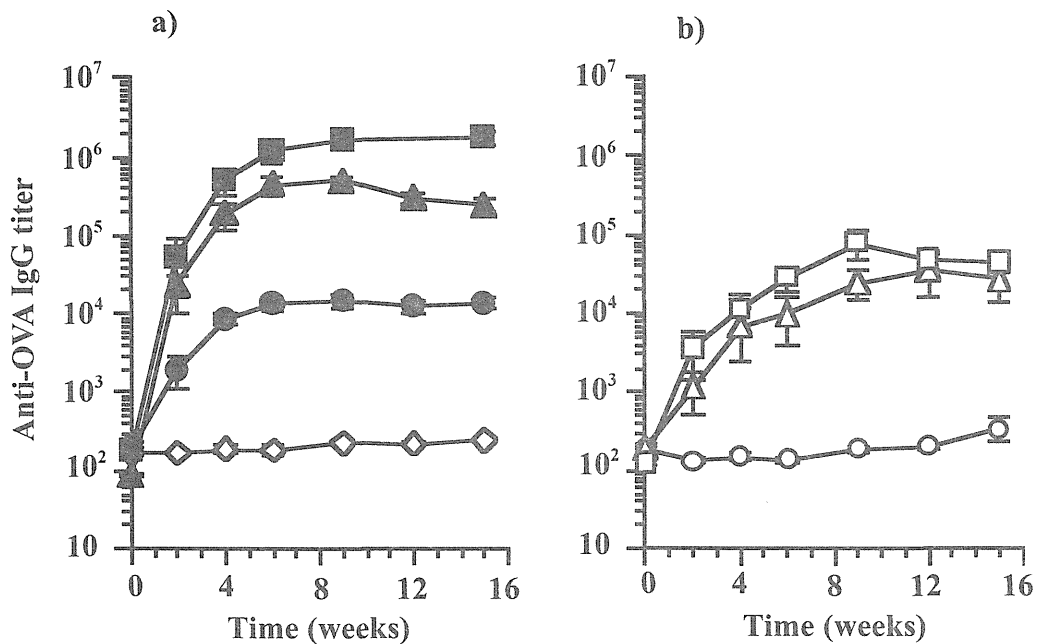


Fig. 33 Anti-OVA IgG antibody responses in the serum induced by various immunization in mice

a) s.c. injection of ●; OVA solution, ▲; PLG MS suspension, ■; OVA solution with FCA

b) Particle bombardment at helium pressure of ○; 100 psi, △; 200 psi, □; 300 psi

◇; Non-treated

Each data point represents the mean and standard error (n=5-8).

無処置群のマウスでは、抗OVA IgG抗体力価に変化が認められなかったが、OVA生理食塩液をマウス背部皮下に注射すると、抗OVA IgG抗体力価は徐々に増加し、免疫処置後6週目以降からプラトーとなった。粒子径75-100 μm のOVA含有PLG MSを生理食塩液中に懸濁させて皮下注射すると、抗OVA IgG抗体力価は著しく増加し、OVA生理食塩液の皮下注射よりも有意に高かった。この結果から、OVA含有PLG MSにはアジュバント効果があると考えられた。しかし、Fig. 30で示したようなOVA放出プロファイルの特性による追加免疫処置のような効果は観察されなかった。これはin vitro OVA放出実験の条件が皮膚中での環境を忠実に再現していないことが原因と考えられる。さらに、ポジティブコントロールであるFCAとOVA生理食塩液を乳化して皮下注射した群では、抗OVA IgG抗体力価は著しく増大し、OVA含有PLG MS懸濁液の皮

下注射群よりも高かった。

一方、Helios™ gun systemを用いて粒子径75-100 μmのOVA含有PLG MSをマウス腹部皮膚内に導入した後の抗OVA IgG抗体力価は、ヘリウム圧が100 psiでは、無処置群と同様なプロファイルを描き、抗体応答が観察されなかった。ヘリウム圧200 psiではコントロールであるOVA生理食塩液を皮下注射した群とほぼ同等なプロファイルを示し、ヘリウム圧300 psiでは、OVA生理食塩液の皮下注射群よりも免疫処置後9週目以降から有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。しかし、OVA含有PLG MS懸濁液及びポジティブコントロールのFCAの皮下注射群よりも低かった。このOVA含有PLG MS懸濁液の皮下注射群との抗OVA IgG抗体力価の差は、OVA含有PLG MSの皮膚内導入率の差によるものと考えられた。

Fig. 34にHelios™ gun systemを用いて粒子径75-100 μmのOVA含有PLG MS 1.0 mgを種々ヘリウム圧で投与してから9週後の抗OVA IgG抗体力価に対するヘリウム圧の影響を示す。抗OVA IgG抗体力価はヘリウム圧に依存して高くなり、ヘリウム圧300 psiではコントロールのOVA生理食塩液の皮下注射と比較して有意に高

い値を示した ($P < 0.05$)。これらの結果はHelios™ gun systemを用いて粒子径75-100 μmのOVA含有PLG MS 1.0 mgをヘリウム圧300 psiで投与すると、従来までのOVA水溶液の皮下注射と比較して効果的に抗体応答

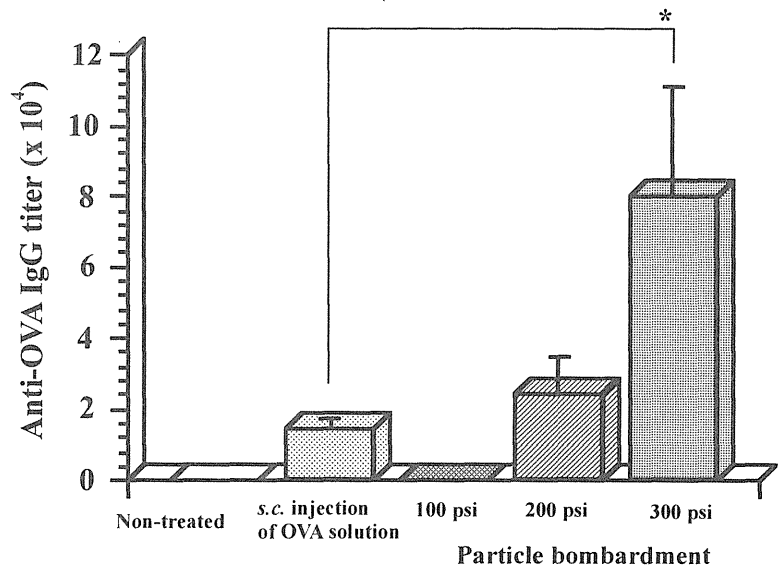


Fig. 34 Effect of helium pressure on anti-OVA IgG titer in the serum 9 weeks after bombardment of OVA-loaded PLG MS

Each data column represents the mean and standard error (n=5-6).

Significant differences, * $P < 0.05$

を誘導することを示している。よって、本システムでのワクチン接種が抗体応答を誘導できることを示唆している。

Fig. 35に第2編—第1章で得られたOVA含有PLG MSの皮膚内導入率と免疫処置後9週目の抗OVA IgG抗体力価との関係を示す。抗OVA IgG抗体力価はOVA含有PLG MSの皮膚内導入率に依存し、両者の間に相関関係が認められた ($r = 0.997, P < 0.05$)。しかしながら、ヘリウム圧が100 psiのとき、OVA含有PLG MSの皮膚内導入率が約5%であるにも関わらず、抗OVA IgG抗体力価の増大が認められなかった。この結果はFig. 31aが示すように完全に皮膚内に導入されずに皮膚表面上に付着したようなOVA含有PLG MSが存在したことから、この皮膚内導入率約5%に相当する粒子が抗体応答に寄与しなかったことが原因だと考えられる。さらに、直線回帰したときにx切片（約5.5%）を生じたことから、皮膚内に導入されても有効に利用される領域（深度）にまで到達しない粒子が存在すると考えられた。

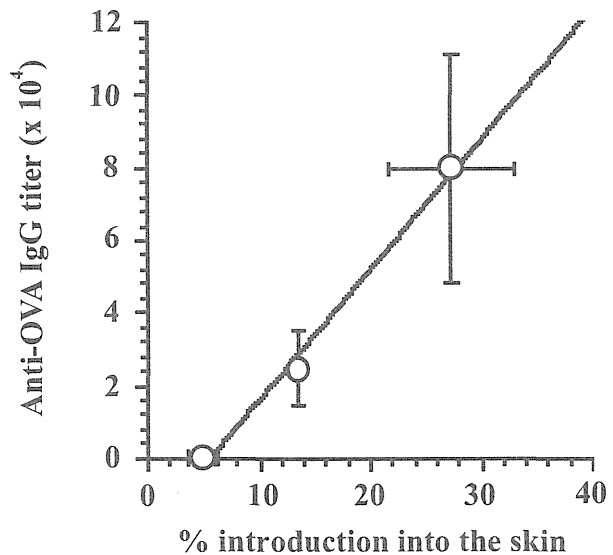


Fig. 35 Relationship between % introduction of PLG MS into the skin and anti-OVA IgG titer in the serum 9 weeks after bombardment of OVA-loaded PLG MS
Each data point represents the mean and standard error (n=3-6).
Correlation coefficient, $r = 0.997$ ($P < 0.05$)

第2節 Particle bombardment systemを用いた免疫処置による免疫応答性

前節において、particle bombardment systemが粉末薬物の送達だけでなく、皮膚を介したワクチン送達にも応用可能であり、抗体応答も誘導できること

が示された。免疫応答は主に細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL)、マクロファージ (大食細胞) 等を介してウイルス感染細胞・移植細胞・腫瘍細胞の排除、細胞内寄生性細菌 (結核菌など)・真菌・原虫の殺作用に働く細胞性免疫応答とB細胞により産出される抗体を介して排除する体液性免疫応答に大別される⁵⁷⁾。感染細菌やウイルスの種類により必要とされる免疫応答に差異があるが、一般的に、細胞性免疫応答の方が体液性免疫応答よりも強力な効果を有するといわれ、現行のワクチン接種法では誘導され難いといわれている⁵⁷⁾。また、免疫処置する動物種、遺伝的な要因等により誘導される免疫応答が異なるともいわれている⁵⁷⁾。これら免疫応答に重要な役割を担っているのがT細胞であり、Fig. 28のように、抗原提示細胞からナイーブT細胞が抗原提示を受けると一連の免疫応答が開始され、この感作T細胞はやがてリンパ節を離れ、リンパ管から胸管に入り、次いで頸部で静脈内に入り、全身循環される。対応する抗原を提示している細胞に出会うと、そこでサイトカイン産出などの反応を開始すると考えられる⁵⁷⁾。

また、T細胞はFig. 36に示すように分化し成熟する。成熟T細胞は表面にCD4分子を表出しているものとCD8分子を表出しているものとに大別され、CD8分子を表出しているT細胞 (CD8⁺T細胞) はCTLとして機能し、CD4分子を表出しているT細胞 (CD4⁺T細胞) はB細胞が抗体を産出するのを補助したり、異質細胞を破壊するCTLの出現を助けたり、マクロファージが殺作用を営むように仕向けたりするヘルパーT (Th) 細胞として機能する。CD4⁺T細胞のそれらの補助作用は主にサイトカイン (細胞が産出し他の細胞の増殖・活性化・分化などを誘導する蛋白) を産生してそれを相手の細胞に作用させることによるが、CD4⁺T細胞にも産生するサイトカインの種類により相違があることが明らかとなっている。つまり、インターロイキン2 (IL-2) やインターフェロン γ (IFN- γ)、リンホトキシン (TNF- β) を産生するTh1細胞とIL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13を産生するTh2細胞及び、両方を産生するTh0細胞に分類される。CTLがIL-2の作用で誘導され、マクロファージがIFN- γ やIL-2によって活性化されることから、Th1細胞は細胞性免疫応答の誘導を支持しており、一方、抗原と反応したB細胞がIL-4、IL-5、IL-10などの作用で増殖し、IL-4、IL-5、IL-6、

IL-10、IL-13の作用を受けて抗体産生細胞に分化することから、Th2細胞は体液性免疫応答の誘導を支持している。また、両者は相互抑制的な関係にある、つまり、Th1細胞の産生するIFN- γ はTh2細胞の作用を抑制し、Th2細胞の産生するIL-4やIL-10はTh1細胞の作用を抑制する⁵⁷⁾。

そこで本節では、particle bombardment systemを用いた粒子径75-100 μm のOVA含有PLG MSでの免疫処置により誘導される免疫応答性についてコントロールのOVA水溶液の皮下注射及びポジティブコントロールのOVA水溶液とFCAの皮下注射と比較した。つまり、Fig. 36で示したように、Th1細胞が産生するIFN- γ とTh2細胞が産生するIL-4を測定し、これらのサイトカインがB細胞に作用することにより産生される抗体、それぞれIgG_{2a}とIgG₁を測定して、ヘルパーT細胞応答のタイプ (Th1 or Th2応答) を見積ることにより、細胞性免疫応答と体液性免疫応答のどちらを優位に誘導しているのかを推察した⁶³⁾。

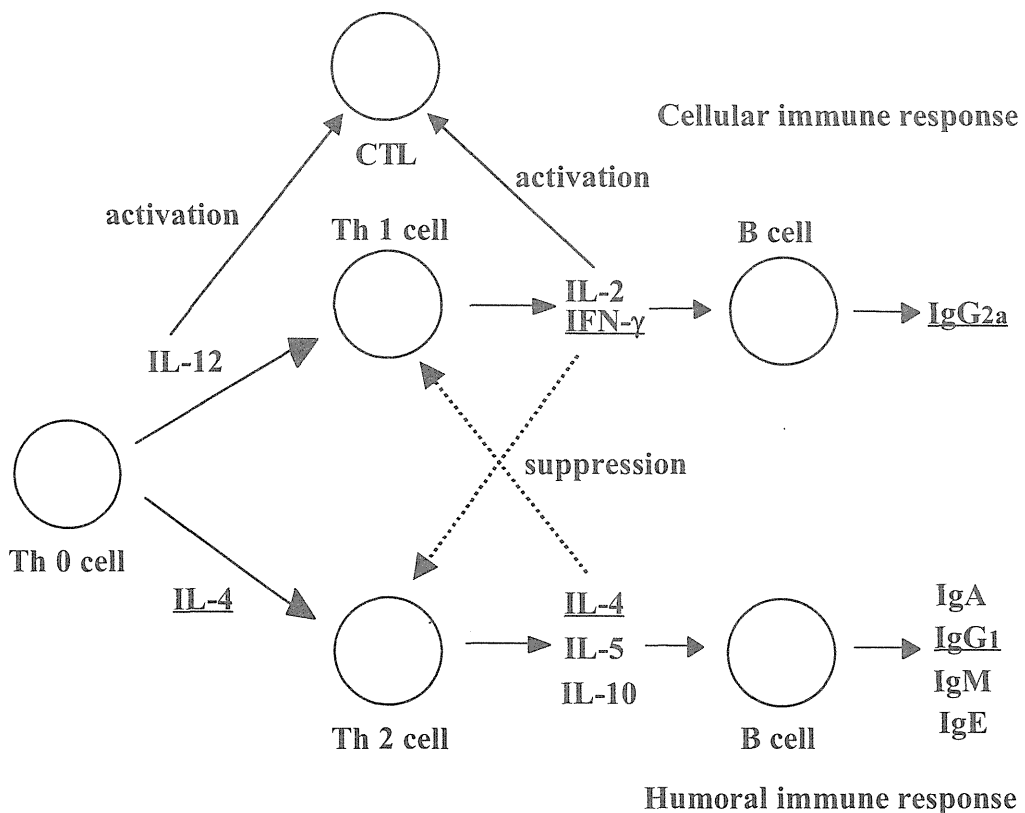


Fig. 36 Differentiation and function of T cell

Fig. 37に種々免疫処置後6週目にマウス脾臓細胞を摘出し、種々OVA濃度で再刺激した後のサイトカイン産生量 (a; IL-4産生量、b; IFN- γ 産生量) を示す。OVA生理食塩液を皮下注射したコントロール群において、IFN- γ 産生量は再刺激したOVA濃度を増大させても無処置群とほとんど同様で変化が認められなかったが、IL-4産生量は無処置群と異なり、再刺激したOVA濃度に依存して増加した。また、同様な傾向がHelios™ gun systemを用いたOVA含有PLG MSの免疫処置群でも認められた。一方、体液性免疫応答のみならず、細胞性免疫応答をも誘導するといわれるFCAとOVA生理食塩液を皮下注射したポジティブコントロール群では、IL-4及びIFN- γ 産生量が無処置群と比較して再刺激したOVAの濃度に依存して増大した⁶⁴⁾。これらの結果から、Helios™ gun systemを用いた粒子径75-100 μ mのOVA含有PLG MSの免疫処置により誘導される免疫応答はOVA生理食塩液を皮下注射することにより得られる免疫応答と同様なTh2優位の免疫応答、つまり体液性免疫応答が優位に誘導されることが推察された。一方、FCAとOVA生理食塩液を皮下注射したポジティブコントロール群では、Th1及びTh2型の両方の免疫応答、つまり細胞性免疫応答及び体液性免疫応答の両方が誘導されていることが推察された。

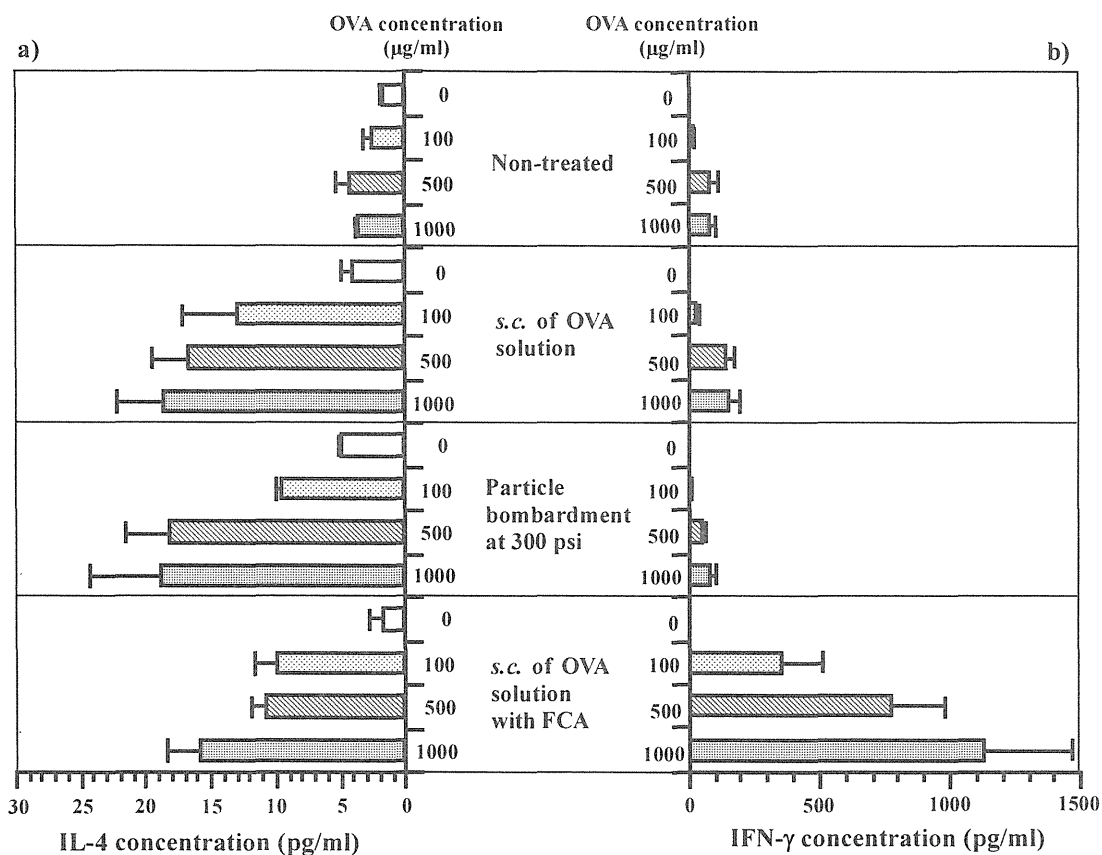


Fig. 37 Cytokine productions from splenocytes immunized by various conditions in mice

a) IL-4 production, b) IFN- γ production

Each data column represents the mean and standard error (n=3-6).

次に、これらヘルパーT細胞等により産生されるIL-4、IFN- γ 等のサイトカインがB細胞に作用し、B細胞から産生される抗体のうち、Th1細胞を經由して産生される抗体IgG_{2a}とTh2細胞を經由して産生される抗体IgG₁を定量することにより、さらに、Helios™ gun systemを用いた粒子径75-100 μ mのOVA含有PLG MSの免疫処置により誘導される免疫応答性について検討を加えた。

Fig. 38に種々免疫処置後の血清中抗OVA IgG₁及びIgG_{2a}抗体力価を示す。いずれの免疫処置においても抗OVA IgG_{2a}抗体力価よりも抗OVA IgG₁抗体力価の方が高い値を示した。OVA生理食塩液を皮下注射したコントロール群におい

て、抗OVA IgG₁抗体力価は増大したが、抗OVA IgG_{2a}抗体力価は変化しなかった。また、particle bombardment systemを用いた粒子径75-100 μmのOVA含有PLG MSによる免疫処置においても、コントロール群と同様な傾向を示した。一方、FCAとOVA生理食塩液を皮下注射したポジティブコントロール群では、抗OVA IgG₁抗体力価のみならず抗OVA IgG_{2a}抗体力価が増加した。これらの結果から、Helios™ gun systemを用いた粒子径75-100 μmのOVA含有PLG MSによる免疫処置はOVA生理食塩液の皮下注射により誘導される免疫応答と同様のTh2優位の免疫応答、つまり体液性免疫応答が優位に誘導されていることが強く示唆された。また、体液性免疫応答のみならず細胞性免疫応答をも誘導すると報告されているFCAとOVAをとともに免疫処置したポジティブコントロール群では、Th2型に加えてTh1型の免疫応答も誘導されることが強く示唆された。

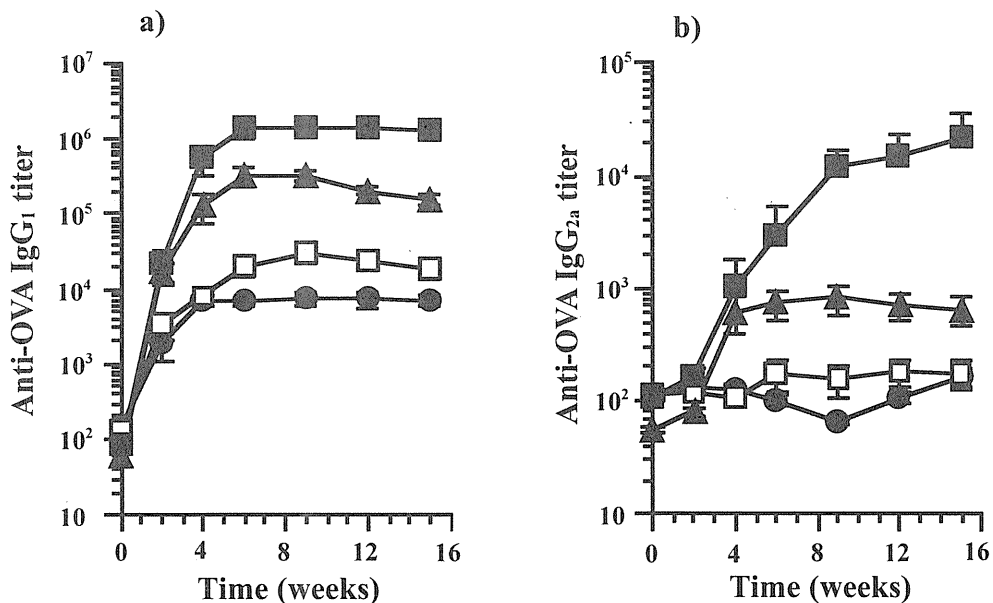


Fig. 38 Anti-OVA antibodies responses in the serum induced by various immunization in mice

a) Anti-OVA IgG₁ titer profile, b) Anti-OVA IgG_{2a} titer profile

□; Particle bombardment at 300 psi, ●; s.c. injection of OVA solution, ▲; s.c. injection of PLG MS suspension, ■; s.c. injection of OVA solution with FCA

Each data point represents the mean and standard error (n=5-8).

CTL応答やTh1型の免疫応答、つまり細胞性免疫応答の誘導はウイルス及び細胞内感染細菌の感染防御において重要な役割を担う。しかしながら、ここ数十年間に数多く登場し、研究されているサブユニットワクチン^{65, 66)}、病原菌の重要なエピトープを含有した合成ペプチド^{67, 68)}及び病原菌の抗原をコードした遺伝子からなるDNAワクチン⁶⁹⁻⁷¹⁾等は従来までのワクチンと比較すると有用性が認められるが、これらのワクチンを皮下及び筋肉内注射した場合、従来のワクチンと同様にその免疫原性に制限があるという問題を提示している。つまり、これらの結果は複製能力のない抗原を皮下及び筋肉内注射しても、主に体液性免疫応答が誘導され、CTL応答は誘導されないことを示していた。それゆえに、十分な感染防御免疫を誘導するために、新規ワクチン送達法やアジュバントが必要とされる³³⁾が、現在、ヒトでの使用が唯一認可されているアジュバントは水酸化アルミニウムゲル (Alum) のみである。Alumは安全性に優れているが、細胞性免疫応答誘導能に乏しく、抗体応答誘導能も比較的弱いという欠点を有する⁷²⁾。

そこで、新規ワクチン送達法であるparticle bombardment systemによるTh1型の免疫応答の誘導のアジュバント効果が期待されたが、前節のサイトカイン (IL-4及びIFN- γ) と抗OVA IgGサブクラス (IgG₁及びIgG_{2a}) 抗体力価のプロファイルから、OVA生理食塩液の皮下注射と同様に主にTh2優位の免疫応答であることが示唆された。

一般に、抗原提示細胞の抗原認識の違いによりCTL応答とTh応答のどちらかを誘導することが報告されている、つまり、細胞外寄生性病原体⁷³⁻⁷⁵⁾等の外因性抗原は抗原提示細胞にエンドサイトーシスで取込まれて、Th応答を誘導するのに対し、細胞内寄生性病原体⁷⁶⁻⁷⁸⁾や癌^{78, 80)}等の内因性抗原ではCTL応答を誘導するといわれている。また、Th1とTh2細胞のどちらが働くかには、抗原がマクロファージによって提示されるかB細胞によって提示されるか、Th0細胞にIL-12が働くかIL-4が働くか、抗原密度が高いか低いかなどが関係していて、抗原物質の性質によってそれが決定される可能性がある。それゆえ、Helios™ gun systemを用いた粒子径75-100 μm のOVA含有PLG MSの免疫処置において、Th2優位の免疫応答を誘導した要因に、皮膚内に導入されるOVA含有

PLG MSの粒子径により抗原提示細胞の抗原提示経路が異なる点が考えられる。抗原提示細胞は5-10 μm と大きな細胞ではあるが、これよりもさらに大きい粒子径75-100 μm のOVA含有PLG MSはその粒子サイズのために、抗原提示細胞のファゴサイトーシスによる経路は考えられず、PLG MSから放出されたOVAがピノサイトーシスにより抗原提示細胞に取り込まれると考えられる。その結果、ペプチドに分解されたOVAは主要組織適合遺伝子複合体クラスII (MHC class II) と共に細胞表面上に提示されると、ヘルパーT細胞がこれを認識し、ヘルパーT細胞応答が開始される。そして、OVAはアレルゲンであるために、Th2優位の免疫応答を誘導したと考えられた。

第3節 本章の考察

本章では、particle bombardment system による粒子径 75-100 μm の OVA 含有 PLG MS の皮膚内導入が免疫処置方法として有用であるかどうかを評価し、それにより誘導される免疫応答性について検討を加えた。その結果、Helios™ gun system を用いて OVA 含有 PLG MS 1.0 mg をヘリウム圧 300 psi で免疫処置したとき、同量の OVA を含有する生理食塩液の皮下注射したときよりも有意に高い抗体力価を示したことから、この新規送達システムでの免疫処置が従来の免疫処置よりも有用であることを証明した。その免疫応答性は Fig. 39 に示すように、OVA 生理食塩液の皮下注射と同様の Th2 優位の免疫応答であることが判明した。その原因のひとつに、皮膚内に導入される OVA 含有 PLG MS の粒子径が大きすぎるために、PLG MS から放出された OVA が外来性抗原としてエンドサイトーシスで抗原提示細胞に取り込まれることが考えられる。よって、この particle bombardment system を用いた免疫処置法をより有用なものとするためには、このシステムを用いた免疫処置法で CTL⁸⁰⁾や Th1 型⁴³⁾の免疫応答及び粘膜免疫応答⁸¹⁾を誘導できるように、装置及び微粒子の改良を含めたシステムの改善が必要となるであろう。

以上の結果より、particle bombardment system を用いた免疫処置法は、従来の抗原水溶液を皮下並びに筋肉内注射する免疫処置法に取って代わる、将来有望な免疫処置法になると考えられた。

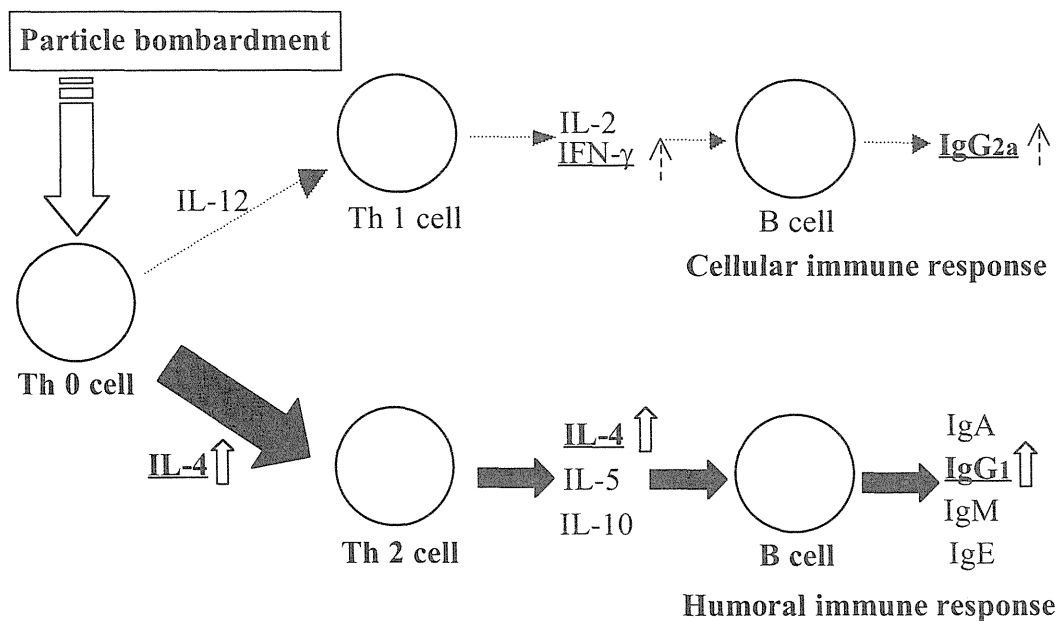


Fig. 39 Th response after bombardment of OVA-loaded PLG MS with 75-100 μm in diameter

結論

高速気体を利用した薬物又は薬物含有微粒子の皮内又は皮下送達システム (particle bombardment system) は、粉末薬物粒子を直接皮膚内に導入できるため、皮膚の透過バリアーである角質層が問題とはならず、適応薬物の選択基準がそれ自身の物理化学的な性質に左右されないばかりか薬物の安定性の問題をも解決できる等の利点を有している。

著者は、この皮膚内送達システム (particle bombardment system) の可能性について検討した結果、以下の結論を得た。

(1) 破裂膜として厚さ 10 μm のポリ塩化ビニルフィルムを装着した新規カートリッジコンテナを用いることで、Helios™ gun system による粒子径数十 μm の薬物含有微粒子の皮膚内送達が可能となり、さらに微粒子の投与量を定量的にコントロールでき、かつ簡便な投与方法であることを示した。また、噴射後のカートリッジコンテナ中に残存する薬物量の測定や粒子の軌道の観察結果から、この新規カートリッジコンテナが粒子径数十 μm の微粒子を皮膚内に送達するのに適切に機能し、そのほとんどがカートリッジコンテナから射出され皮膚に直線的に向かっていることを明らかにした。これらの結果から、破裂膜を装着した新規カートリッジコンテナを用いることにより、既知量の粒子径数十 μm の微粒子を安定に保持し、これら微粒子を定量的に皮膚内に送達できることが明らかとなった。

(2) Particle bombardment system を用いた IDM 含有 PLA MS の皮膚内導入及び IDM の全身送達に関する検討結果から、このシステムを用いることにより、IDM 含有 PLA MS を皮膚内に導入でき、さらに IDM を全身送達できることが明らかとなった。IDM 皮膚内導入率はヘリウム圧及び粒子径を調節することで増加し、それらに依存して IDM の C_{max} 、 $AUC_{0-24\text{h}}$ 及び $F_{0-24\text{h}}$ も大きくなった。より効果的な IDM 皮膚内導入率、 $F_{0-24\text{h}}$ 及び皮膚障害性の軽減は投与量を制御することで得られることが明らかとなった。従って、ヘリウム圧と投与

量の適切な組み合わせにより、様々な薬物の薬理作用を発揮するのに必要とされる量を、粒子径の大きな微粒子を用いて送達できると考えられる。しかしながら、投与量の減少は血中濃度及び AUC_{0-24h} を減少させた。そこで粒子径の大きな微粒子を用い、1回の投与量をなるべく少量にして異なる部位に複数回投与すると、効率的に IDM 含有 PLA MS が皮膚内に導入され、しかも高い F_{0-24h} 、 C_{max} 、及び AUC_{0-24h} が得られた。以上の結果から、particle bombardment system において、高いヘリウム圧を用い粒子径の大きな微粒子を少ない投与量で単回及び異なる部位に複数回投与することが、用量の異なる様々な薬物を効率的でかつ安全に皮膚内導入及び全身送達できる方法であると考えられた。

(3) PIV を用いて Helios™ gun system から噴射されて、皮膚内に導入されるまでの IDM 含有 PLA MS 群の軌道を観察した結果、Helios™ gun system から噴射された IDM 含有 PLA MS は瞬時に最高速度に到達し、その速度を維持したままほぼ一直線に進行した。また、Helios™ gun system から噴射される IDM 含有 PLA MS 群の軌道を詳細に観察したところ、噴射初期の高速な IDM 含有 PLA MS 群に続いて、それよりも遅れて噴射される IDM 含有 PLA MS 群が観察され、この IDM 含有 PLA MS 群は明らかに速度が減少していると予測された。さらに、IDM 含有 PLA MS の投与量の増加で遅れて噴射される IDM 含有 PLA MS 群が多く観察され、かつ投与量の増加で導入率が減少することから、この IDM 含有 PLA MS 群は皮膚内に導入されにくいと考えられた。そして、Helios™ gun system から噴射された IDM 含有 PLA MS 群が皮膚に衝突すると、その一部の IDM 含有 PLA MS 群は皮膚表面上で跳ね返されることが明らかとなったから、皮膚の物理化学的性質（粘弾性等）も導入率に影響すると思われる。

さらに、ヘリウム圧、粒子径及び投与量を変えたときの粒子速度及び粒子質量と、IDM 皮膚内導入率及び F_{0-24h} との関係について調べ、IDM 含有 PLA MS の皮膚内導入に関与する因子について検討した結果、いずれのパラメータも皮膚内導入率及び F_{0-24h} に影響したが、主に粒子速度が決定因子であることが

明らかとなった。つまり、噴射の駆動力であるヘリウム圧及び噴射される微粒子の投与量は主に噴射される微粒子の粒子速度に影響し、一方、噴射される微粒子の粒子径は主に粒子質量に影響して、それぞれ粒子個々の運動エネルギーに影響し、結果的に微粒子の皮膚内導入率及び F_{0-24h} に対して影響を及ぼしていると考えられ、その影響は粒子質量よりもむしろ、粒子速度の方が大きいことが明らかとなった。

(4) Particle bombardment system を用いた抗原含有微粒子の皮膚内導入が免疫処置方法として有用であるかどうかを検討した結果、粒子径 75-100 μm の OVA 含有 PLG MS 1.0 mg をヘリウム圧 300 psi で免疫処置したとき、同量の OVA を含有する生理食塩液の皮下注射したときよりも有意に高い抗体力価を示したことから、この新規送達システムでの免疫処置が従来の免疫処置よりも有用であることを証明した。また、このシステムを用いることにより誘導される免疫応答性について検討した結果、その免疫応答性は OVA 生理食塩液の皮下注射と同様の Th2 優位の免疫応答であることが明らかとなった。従って、この particle bombardment system を用いた免疫処置法により、CTL や Th1 型の免疫応答及び粘膜免疫応答を誘導できるようになれば、このシステムを用いた免疫処置法は、従来の抗原水溶液を皮下並びに筋肉内注射する免疫処置法に取って代わる、将来有望な免疫処置法になると考えられた。

以上、高速気体を利用した薬物含有微粒子の皮膚内送達について論じた。particle bombardment system は、種々の薬物を固体微粒子化して、ヘリウム圧、微粒子の粒子径及び投与量を調節することにより、皮膚内及び全身に送達するのに非常に有用であり、これまで経皮吸収型製剤の開発が断念されていた薬物においても十分応用可能であると考えられた。また、薬物の放出を制御することによる投与回数の減少や自己投与が可能な点においても、新規薬物送達法として期待されると思われる。

本研究では遺伝子銃を代用してこの新規薬物送達法に関する基礎的なデータを与えたが、今後装置や導入する微粒子等を改善することで、特に皮膚吸

収性の低い水溶性高分子医薬品（ペプチド及び蛋白性医薬品、ワクチン）等への応用が期待される新規薬物送達システムになると考えられる。

謝辞

本研究に際し、城西大学薬学部病院薬剤学教室教授 森本雍憲先生には、研究テーマの決定から結論に至るまで、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜り衷心より深甚なる謝意を表します。

城西大学薬学部臨床薬物動態学教室教授 杉林堅次先生には実験の細部にわたり終始御指導並びに御助言を賜り、深謝の意を表します。

また、本研究に際し終始有益な御指導並びに御助言を賜りました城西大学薬学部薬剤学教室教授 従二和彦先生、城西大学薬学部薬物治療学教室講師 夏目秀視先生並びに城西大学薬学部講師 小林大介先生に深謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行に当たり、実験に関するデータ解析等の有益な御助言並びに御指導を賜りました城西大学薬学部病院薬剤学教室助手 沼尻幸彦先生 上田秀雄先生並びに城西大学薬学部薬剤学教室助手 関俊暢先生に深謝の意を表します。

また、実験の一部に御協力頂き、有益な御助言並びに御指導を賜りました浙江大学薬学院副教授 金一先生に深謝の意を表します。

さらに、噴射微粒子の速度に関する実験に御協力頂き、データの解析等に有益な御助言並びに御指導を賜りました東京電機大学理工学部生命工学科教授 内田干城先生に深謝の意を表します。

最後に、本研究に終始御協力頂きました城西大学薬学部旧製剤学教室、病院薬剤学教室、臨床薬物動態学教室 並びに薬剤学教室の諸氏に深く感謝致します。

実験の部

実験の部

第 1 編 実験の部

第 1 章

(1) 実験材料

フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識ポリスチレンマイクロスフィア (平均粒子径 45 μm) は Polysciences, Inc. (Warrington, PA, USA) から購入した。ローダミン 6G は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。ポリ塩化ビニルフィルム (破裂膜、厚さ 10 μm) は日立化成フィルテック株式会社 (東京) から購入した。その他の試薬は市販の特級又は 1 級品を用いた。

(2) 実験動物

雄性 WBN/ILA-Ht ヘアレスラット (体重 240-290 g) は城西大学生命科学センター (埼玉) から得た。

(3) Helios™ gun system を用いた微粒子 (マイクロスフィア) の皮膚内送達法

カートリッジコンテナー内に既知量の薬物含有微粒子を保持するために、新規カートリッジコンテナーを破裂膜、ステンレス製チューブ (長さ 15 mm、内径 2 mm) 及びステンレス製リング (長さ 5 mm、内径 2 mm、外径 3 mm) を用いて組み立てた。破裂膜にはポリ塩化ビニルフィルム (厚さ 10 μm) を用いた。破裂膜をステンレス製チューブとリングの間に挟み、ステンレス製チューブの底に破裂膜を装着させた。その中に既知量の微粒子 (マイクロスフィア) (0.5、1.0 及び 3.0 mg) を充填した。微粒子を充填したカートリッジコンテナーを 12 個の穴を持つカートリッジホルダーにそれぞれ納めた。そのカートリッジホルダーを、ヘリウムガス (純度 99.9999%) ボンベに接続した Helios™ gene gun system (Helios™ gun system ; Bio-Rad Laboratories, Richmond,

CA, USA) にセットした。そのボンベに取り付けた Helios™ gun system 専用のレギュレーターによりヘリウム圧を 100、200 及び 300 psi に設定した。その装置先端のバレルライナーのスペイサー部分 (直径約 25 mm) を動物 (ラット及びマウス) の皮膚に垂直になるようにあてがい、トリガーボタンを引いて微粒子を皮膚に噴射した。そのときヘリウムガスのメインバルブが開き破裂膜が容易に破裂してカートリッジコンテナ内の微粒子が高速に加速され皮膚に向かって進行する。

(4) 共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いた組織学的実験法

ウレタン麻酔下 (1 mg/kg *i.p.*) 雄性ヘアレスラットの腹部のうぶ毛を除毛した。第 1 編—第 1 章(3)と同様に、破裂膜を装着したカートリッジコンテナに FITC 標識ポリスチレンマイクロスフィア (平均粒子径 45 µm) 3.0 mg を充填しホルダーにセットした後、Helios™ gun system を除毛した腹部にあてがった。Helios™ gun system をヘリウム圧 100、200 及び 300 psi で作動し、ポリスチレンマイクロスフィアを皮膚に向かって噴射した直後に、噴射部位皮膚約 5 cm² (直径 25 mm) を摘出し、-20℃に保った凍結切片作製機 (Microtome Cryostat, Damon/Ice Division, MA, USA) 内に入れ凍結させた。凍結皮膚を Tissue-Teck® (Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan) でテーブルに固定し、厚さ約 30 µm の深さ方向に垂直な皮膚断面切片を調製した。得られた切片をスライドガラス上に固定した後、0.5 mM ローダミン 6G を添加して皮膚を染色した。FITC 標識ポリスチレンマイクロスフィア及びローダミン 6G の蛍光をそれぞれ励起波長 488 nm 及び 514 nm、蛍光波長 515 nm 及び 550 nm を用いて共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (CLSM, MRC-600 Lasersharp System, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) で観察した。画像データは Comos software (Bio-Rad Laboratories) を用いてコンピュータ処理した。

第 2 章

(1) 実験材料

インドメタシン (IDM) は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。ポリ-L-乳酸 (PLA) (M.W. abt. 10,000) はナカライテスク株式会社 (京都) から購入した。p-ヒドロキシ安息香酸 n-ヘキシルは東京化成工業株式会社 (東京) から購入した。破裂膜は第 1 編—第 1 章と同様なものを用いた。その他の試薬は市販の特級又は 1 級品を用いた。

(2) 実験動物

第 1 編—第 1 章と同様の動物を用いた。

(3) IDM 含有 PLA MS の調製

O/W solvent evaporation method にて調製した。IDM (100 mg) と PLA (300 mg) をジクロロメタン (CH_2Cl_2 , 3 ml) に溶解させ、その溶液を氷冷下の 0.5% ポリビニルアルコール (PVA) 水溶液 (150 ml) 中に 2,500 rpm で攪拌しながら加えた。その混合溶液を室温、2,000 rpm で 25 分間攪拌した後、37°C、1,000 rpm で 5 時間攪拌して徐々にジクロロメタンを蒸発させ、PLA をマイクロスフィアとして固化させた。固化した IDM 含有 PLA MS を 3,500 rpm で遠心分離し、上清を除去後、蒸留水で 6 回洗浄した。洗浄した PLA MS を凍結乾燥後、得られた PLA MS をステンレス製のふるいを用いて粒子径 20-38、44-53 及び 75-100 μm に分級した。

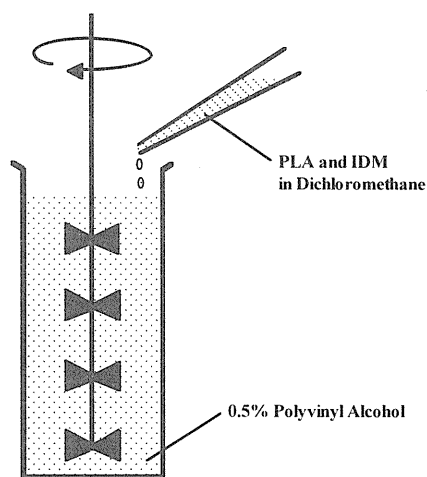


Fig. 40 Apparatus for preparation of IDM-loaded PLA MS

(4) IDM 含有 PLA MS の形状の観察

調製した IDM 含有 PLA MS をイオンコーター (IB-3、Eiko) で白金-パラジウム蒸着した後 (蒸着条件 ; 真空度 0.01 Torr. 以下、照射電流 0.65 mA、照射時間 3.5 min)、走査型電子顕微鏡 (X-650、日立製作所株式会社) 下で観察した。

(5) IDM 含有 PLA MS の平均粒子径 (体積-重量平均) の測定

分級した各粒子サイズ範囲の IDM 含有 PLA MS をそれぞれスライドガラスに均一に分散させた後、光学顕微鏡 (AH-2、オリンパス光学工業株式会社) 下で観察し適当と思われる箇所の写真を十数枚撮った。その撮影した PLA MS を無作為に 200-250 個抽出して粒子径を測定することにより平均粒子径 (体積-重量平均) を算出した。

(6) PLA MS 中の IDM 含有率の測定

IDM 含有 PLA MS を正確に 5 mg 量り取り、アセトン (5 ml) に溶解させた。その溶液をアセトニトリルで希釈し、総容量を 50 ml とした。その溶液中の IDM 量を HPLC により測定し、PLA MS 中の IDM 含有率を算出した。

(7) IDM の放出実験

IDM 含有 PLA MS を正確に 5 mg 量り取り、これに pH 7.4 リン酸緩衝液 (PBS) 7.5 ml を添加して水浴で 37°C に保ち、マグネティックスターラー (マルチスターラー、サイニクス株式会社、東京) にて攪拌した。経時的にサンプル (200 μ l) を採取し、細孔 0.45 μ m のフィルター (Millex[®], Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) を用いてろ過した。液量を一定に保つためその都度同量の pH 7.4 PBS を補充した。そのサンプル中の IDM 量を HPLC により測定し、IDM 放出量を算出した。

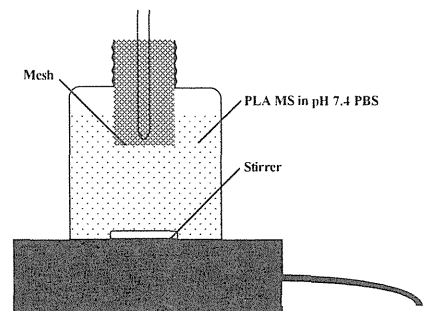


Fig. 41 Apparatus for in vitro IDM release test

(8) IDM 含有 PLA MS の皮膚内送達法

ウレタン麻酔下 (1 mg/kg *i.p.*) 雄性ヘアレスラットの腹部のうぶ毛を除毛した。第 1 編—第 1 章(3)と同様に、破裂膜を装着したカートリッジコンテナに IDM 含有 PLA MS (粒子径 20-38、44-53 及び 75-100 μm) 0.5、1.0 及び 3.0 mg を充填しホルダーにセットした後、Helios™ gun system を除毛した腹部にあてがった。Helios™ gun system をヘリウム圧 100、200 及び 300 psi で作動し、IDM 含有 PLA MS を皮膚に向かって噴射した。

(9) IDM 皮膚内導入率の測定

上記のように、IDM 含有 PLA MS を噴射した直後に、噴射部位皮膚約 5 cm^2 (直径 25 mm) を摘出した。摘出した皮膚表面を生理食塩液 (pH 7.2) で洗浄し、pH 7.4 PBS 2.5 又は 5.0 ml を添加してホモジナイザー (POLYTRON® PT 3000, KINEMATICA AG, Switzerland) を用いて氷冷下 15,000 rpm で 5 分間ホモジナイズした。その皮膚ホモジネートにアセトンとアセトニトリルを 1 : 4 の割合で添加し、総容量を 7.5 又は 15.0 ml とした。その混合溶液を攪拌した後、4°C、18,000 x g で 5 分間遠心分離して上清を採取し、サンプルとした。そのサンプル中の IDM 量を HPLC により測定した。IDM 皮膚内導入率は次式により算出した。

$$\text{IDM 皮膚内導入率 (\%)} = \frac{\text{皮膚中の総IDM量}}{\text{IDM の充填量}} \times 100$$

ここで IDM の充填量とはカートリッジコンテナに充填した PLA MS 中の IDM 含量を示す。

(10) IDM 含有 PLA MS の複数回投与方法及び IDM 皮膚内導入率の測定

ウレタン麻酔下 (1 mg/kg *i.p.*) 雄性ヘアレスラットの腹部のうぶ毛を除毛した。第 1 編—第 1 章(3)と同様に、破裂膜を装着した各々のカートリッジコンテナに粒子径 75-100 μm の IDM 含有 PLA MS 1.0 mg をそれぞれ充填しホルダーにセットした後、Helios™ gun system を除毛した腹部にあてがった。Helios™ gun system をヘリウム圧 300 psi で作動し、IDM 含有 PLA MS を異な

る3個所の皮膚に向かって噴射した。

噴射部位皮膚（直径 25 mm、面積 5 cm² が3つ）を噴射直後に摘出し、その後の処置は第1編—第2章(7)の手順で行った。但し、皮膚は 15.0 ml の pH 7.4 PBS でホモジナイズし、アセトン—アセトニトリル（1：4）を添加して総容量を 45.0 ml とした。

(11) 噴射後のカートリッジコンテナ内の IDM 残存率の測定

IDM 含有 PLA MS（粒子径 20-38、44-53 及び 75-100 μm）3.0 mg を Helios™ gun system を用いて噴射した後、カートリッジコンテナを取り出し、これを pH 7.4 PBS 1.0 ml 中に添加し、37 °C で1時間インキュベートした。その上清を細孔 0.45 μm のフィルター（Millex®, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA）を用いてろ過し、そのろ液中の IDM 量を HPLC により測定した。IDM 残存率は次式により算出した。

$$\text{IDM 残存率 (\%)} = \frac{\text{噴射後カートリッジ内の総IDM量}}{\text{IDM の充填量}} \times 100$$

(12) IDM の定量法

採取したサンプルに同量の内部標準物質を含有させたアセトニトリル溶液を添加し混合した。その溶液（50-100 μl）を HPLC に注入した。用いた HPLC システムは、送液ユニット（LC-10AS、島津製作所、京都）、紫外分光光度計（SPD-6A、島津製作所、京都）、システムコントローラー（SCL-10A、島津製作所、京都）、カラムオープン（CTO-10A、島津製作所、京都）、オートインジェクター（SIL-10AXL、島津製作所、京都）に逆相分離カラムを装着し、クロマトパック（C-R6A、島津製作所、京都）、を用いてピーク面積法で解析した。定量条件を Table 10 に示した。

Table 10 HPLC condition for IDM

Column	Inertsil ODS-2 (5 μ m, 4.6 x 250 mm)
Column temp.	40 $^{\circ}$ C
Detection	UV 262 nm
Mobile phase	0.1 % phosphoric acid : Acetonitrile = 45 : 55
Flow rate	1.2 ml/min
Internal standard	p-hydroxybenzoic acid hexyl ester

(13) 皮膚障害性（紅斑）の評価

第1編－第2章(8)、(10)と同様にして、IDM含有PLA MS（粒子径20-38、44-53及び75-100 μ m）0.5、1.0及び3.0 mgをHeliosTM gun systemを用いて、ヘリウム圧100、200及び300 psiでヘアレスラット腹部皮膚に向かって噴射した。1時間後、皮膚の紅斑をTable 3で示したDraize scoreにより評価した。また、そのときのヘアレスラット腹部皮膚写真をデジタルカメラ（Fine Pix 700, Fujifilm, Japan）を用いて撮影した。

(14) 統計処理

各処置群間の統計処理は一元配置分散分析法（one-way ANOVA）を用いて分析した後、Fisher's pairing *t*-testを用いて分析した。Draize scoreに対するヘリウム圧、粒子径及び投与量の影響を統計学的に処置するために、Friedman testを用いて分析した。危険率（*P*）が0.05以下のときに有意差があるとみなした。

第3章

(1) 実験材料

第1編－第2章と同様のものを用いた。IDM含有PLA MSは第1編－第2章(3)で調製したものを用いた。

(2) 実験動物

第1編－第1章と同様の動物を用いた。

(3) IDM 溶液の静脈内投与

ウレタン麻酔下 (1 mg/kg *i.p.*) 雄性ヘアレスラットの右頸静脈内に IDM を pH 7.4 PBS に溶解させた溶液 (投与量 0.25 mg/kg) を注射筒及び注射針を用いて投与した。

(4) IDM 溶液の皮内投与

ウレタン麻酔下 (1 mg/kg *i.p.*) 雄性ヘアレスラットの腹部の皮内に IDM を pH 7.4 PBS に溶解させた溶液 (投与量 0.1 mg/kg) 25 μ l を注射筒及び注射針を用いて投与した。

(5) IDM 含有 PLA MS の皮膚内送達法

第1編－第2章 (8)、(10)と同様の方法で行った。

(6) 血漿サンプルの採取

経時的に左頸静脈から採血 (0.2 ml) を行い、4°C、13,600 rpm で5分間遠心分離した後、血漿サンプルを得た。得られた血漿サンプルを測定するまで -20°C で保存した。IDM の血中濃度を HPLC により測定した。

(6) 血漿中の IDM の定量

採取した血漿サンプルに 2 倍量の内部標準物質 (p-ヒドロキシ安息香酸 n-ヘキシル) を含有させたアセトニトリル溶液を添加し混合した。4°C、13,600 rpm で5分間遠心分離して除蛋白し、その上清 (200 μ l) を HPLC に注入した。HPLC のシステムと定量条件は第1編－第2章(12)と同様。

(7) データ解析

血漿データは非線形最小二乗法 (algorithm: Damping Gauss-Newton method)

を用いて解析した。 C_{\max} 及び T_{\max} は IDM 血中濃度－時間曲線から求め、AUC は台形公式 trapezoidal rule で求めた。

皮内投与に対する相対的バイオアベイラビリティ (F_{0-24h}) は次式により求めた。

$$F_{0-24h} = \frac{AUC_{\text{bombard } 0-24h} / \text{Dose}_{\text{bombard}}}{AUC_{i.c. \ 0-24h} / \text{Dose}_{i.c.}} \times 100$$

ここで、 $AUC_{\text{bombard } 0-24h}$ 及び $AUC_{i.c. \ 0-24h}$ はそれぞれ particle bombardment 及び皮内投与後 24 時間までの IDM 血中濃度－時間曲線下面積を示し、 $\text{Dose}_{\text{bombard}}$ 及び $\text{Dose}_{i.c.}$ はそれぞれ particle bombardment 及び皮内投与における IDM 投与量 (mg/kg weight) を示す。

静脈内投与及び皮内投与後の消失パラメータを非線形最小二乗法 (algorithm: Damping Gauss-Newton method) を用い、2-コンパートメントモデルにあてはめ算出した。両者の消失パラメータはほぼ同等であったので (Table 7)、particle bombardment 後の IDM の吸収速度定数 (k_a) 及び吸収プロファイルを皮内投与後の消失パラメータを用いてデコンボリューション法より算出した。Particle bombardment 後の IDM の最大吸収速度 (MAR) を吸収プロファイルの傾きから得た。そのプロファイルの傾きは 10 分間隔で算出した。

統計処理は Student's *t*-test を用いて分析した。危険率 (P) が 0.05 以下のときに有意差があるとみなした。

第 4 章

(1) 実験材料

第 1 編－第 3 章と同様のものを用いた。

(2) 実験動物

第 1 編－第 1 章と同様のものを用いた。

(3) IDM 含有 PLA MS の皮膚内送達法

第 1 編—第 2 章 (8)と同様に行った。

(4) 粒子軌道の観察

Fig. 16 に示したように、Helios™ gun system から噴射される超音速な微粒子群の通路に光源を照らし、種々粒子径 (20-38、44-53 及び 75-100 μm) の IDM 含有 PLA MS (0.5、1.0 及び 3.0 mg) をヘリウム圧 100、200 及び 300 psi で噴射した。Helios™ gun system から噴射される超音速な微粒子群からの散乱光を 1 秒間に 40,500 コマの撮影が可能な高速度カメラ (FASTCAM-ultima-I², Photron co., Japan) を用いて撮影しビデオテープに記録した。

(5) 粒子速度の測定

得られた噴射微粒子群の高速度画像 (写真) から 2 照明間 (第 1 と第 2 の照明) の微粒子群の先端像から局所変位ベクトル及び粒子速度を 2 照明間の時間差と画像の倍率を考慮して求めた。粒子速度は皮膚衝突付近の速度で表示した。

(6) 噴射後の皮膚表面の観察

ウレタン麻酔下 (1 mg/kg *i.p.*) 雄性ヘアレスラットのうぶ毛を除毛した腹部に、粒子径 75-100 μm の IDM 含有 PLA MS 3.0 mg を Helios™ gun system を用いてヘリウム圧 300 psi で皮膚に向かって噴射した。その直後に、噴射部位皮膚 5 cm^2 (直径 25 mm) を摘出し、pH 7.4 PBS で洗浄した後、10 %中性緩衝ホルマリン液 (pH 7.4) 中で固定した。固定した皮膚組織をデシケーター内で 3 日間乾燥した後に、さらに臨界点乾燥装置 (HCP-2、日立製作所) で乾燥した。その皮膚組織をイオンコーター (IB-3、Eiko) によるコーティングを行った後に、走査型電子顕微鏡 (X-650、日立製作所株式会社) により観察した。

(7) 統計処理

統計処理は Student's *t*-test を用いて分析した。危険率 (*P*) が 0.05 以下のときを有意差があるとみなした。

第 2 編 実験の部

第 1 章

(1) 実験材料

Ovalbumin (albumin, chicken egg; Grade V)、ポリ-DL-乳酸グリコール酸共重合体 (50 : 50, M.W. 40,000-75,000) 及び Freund's complete adjuvant は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した。Rhodamine B は Aldrich chemical company, Inc. (Milwaukee, WI, USA) から購入した。Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit は PIERCE (Rockford, IL, USA) から購入した。Fluorescein isothiocyanate (FITC)、ドデシル硫酸ナトリウム、水酸化ナトリウムは和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。破裂膜は第 1 編—第 1 章と同様とした。その他の試薬は市販の特級又は 1 級品を用いた。

(2) 実験動物

雌性 BALB/c マウス (10 週齢) は東京実験動物株式会社 (東京) から購入した。

(3) OVA 含有 PLG MS の調製

w/o/w emulsion / solvent evaporation method にて調製した。OVA 水溶液 (20 mg in 50 μ l water) を PLG 溶液 (200 mg in 3 ml CH_2Cl_2) に加えて、氷冷下でホモジナイザー (Ultra-Turrax[®], IKA-Labortechnik, Germany) を用いて 15,000 rpm、

1 分間乳化し w/o エマルションを調製した。その w/o エマルションを氷冷下の 0.5% PVA 水溶液（約 100 ml）中に 2,500 rpm で攪拌しながら加え、w/o/w エマルションを調製した。氷冷下 2,500 rpm で 30 分間攪拌後、室温、2,000 rpm で 18 時間攪拌して徐々に溶媒を蒸発させ、マイクロスフィアを固化した。固化した OVA 含有 PLG MS を 3,500 rpm で遠心分離して上清を除去した。その後、蒸留水で 6 回洗浄した後、凍結乾燥した。得られた PLG MS をステンレス製のふるいを用いて粒子径 75-100 μm に分級した。

(4) OVA 含有 PLG MS の形状の観察

第 1 編—第 2 章(4)と同様に行った。但し、OVA 含有 PLG MS の内部の観察は、カミソリを用いて OVA 含有 PLG MS の断面を露出させた後に同様に行った。

(5) OVA 含有 PLG MS 中の OVA 含有率の測定

PLG MS を正確に 5 mg 量り取り、5%ドデシル硫酸ナトリウム含有 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液（5% SDS-0.1 N NaOH 水溶液）を加えて OVA 含有 PLG MS を溶解した。その溶液中 OVA 量を BCA protein assay kit を用いて測定し、OVA 含有率を算出した。

(6) PLG MS からの OVA 放出実験

OVA 含有 PLG MS を正確に 5 mg 量り、これに pH 7.4 PBS 1.0 ml を加えた。この懸濁液を 37°C、100 rpm で水平方向に振り混ぜた。経時的に 37°C、2,000 rpm、3 分間遠心分離して上清（60 μl ）を採取した。液量を一定に保つためその都度同量の pH7.4 PBS を加えた。採取した上清中の OVA 量を BCA protein assay kit を用いて測定し、OVA 放出量を算出した。

(7) FITC 標識化 OVA の調製

FITC 及び OVA を濃度がそれぞれ 0.2 及び 20 mg/ml となるように、それぞれ 0.5 mM bicarbonate-carbonate 緩衝液に溶解させた。それぞれの溶液 50 ml を

混合し、4℃で1晩攪拌した。よく洗浄した後、4℃で1晩精製水に浸けておいた透析膜（Seamless Cellulose Tubing、分画分子量 12,000-14,000、三光純薬株式会社、東京）内にこの混合溶液を移し、これを3 Lの0.5 mM bicarbonate-carbonate 緩衝液中で6日間、精製水中で4日間、4℃で透析し、未反応の FITC を取り除いた。なお、外液は1日毎に交換した。この透析膜中の FITC 標識化 OVA 溶液を凍結乾燥して FITC 標識化 OVA を得た。

(8) FITC 標識化 OVA 含有 PLG MS の調製

第2編-第1章(3)と同様な方法で調製した。OVA 20 mg の代わりに FITC 標識化 OVA 8 mg と OVA 12 mg を用いた。

(9) OVA 含有 PLG MS の皮膚内導入法

エーテル吸入麻酔下雌性 BALB/c マウスの除毛した腹部に粒子径 75-100 μm の OVA 含有 PLG MS 1.0 mg を Helios™ gun system を用いて、ヘリウム圧 100、200 及び 300 psi で皮膚に噴射した。

(10) 共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いた組織学的実験法

第1編-第1章(4)と同様な方法で行った。但し、rhodamine 6G 水溶液は 0.1 mM の濃度で使用した。

(11) Rhodamine B 及び OVA 含有 PLG MS の調製

第2編-第1章(3)と同様な方法で調製した。但し、PLG 溶液 (200 mg in 3 ml CH_2Cl_2) に rhodamine B 1.8 mg を添加して調製した。

(12) PLG MS 中の rhodamine B 含有率の測定

PLG MS を正確に 5 mg 量り取り、5% SDS-0.1 N NaOH 水溶液を加えて OVA 含有 PLG MS を溶解した。その溶液をメタノールで 50 倍希釈した。その溶液中の rhodamine B の蛍光強度を励起波長 515 nm、蛍光波長 555 nm で、蛍光分光光度計 (RF-5000、島津製作所、京都) を用いて測定し、rhodamine B 含有

率を算出した。

(13) Rhodamine B 皮膚内導入率の測定

第 2 編—第 1 章(9)で示した方法で、粒子径 75-100 μm の rhodamine B 及び OVA 含有 PLG MS 1.0 mg をヘリウム圧 100、200 及び 300 psi で皮膚に噴射した。その直後に、噴射部位皮膚約 5 cm^2 (直径 25 mm) を摘出した。摘出した皮膚表面を生理食塩液 (pH 7.2) で洗浄し、pH 7.4 PBS 2.0 ml を添加してホモジナイザー (Heidolph DIAX 600, Heidolph co., Germany) を用いて氷冷下 13,500 rpm で 5 分間ホモジナイズした。その皮膚ホモジネートに 10% SDS-0.2 N NaOH 水溶液を加え総容量を 6.0 ml とし、一晚攪拌して PLG MS を完全に溶解させた。その混合溶液に 2 倍容量のメタノールを添加し攪拌して除蛋白した後、4 $^{\circ}\text{C}$ 、18,000 x g で 5 分間遠心分離して上清を採取しサンプルとした。そのサンプル中の rhodamine B の蛍光強度を第 2 編—第 1 章(12)と同様な方法で測定し、rhodamine B 皮膚内導入率を次式により算出した。

$$\text{Rhodamine B 皮膚内導入率 (\%)} = \frac{\text{皮膚中の総rhodamine B量}}{\text{rhodamine B の充填量}} \times 100$$

ここで rhodamine B の充填量とはカートリッジコンテナーに充填した PLG MS 中の rhodamine B 含量を示す。

(14) 統計処理

第 1 編—第 4 章(7)と同様の方法で行った。

第 2 章

(1) 実験材料

Horseshradish-peroxidase (HRP)-labeled goat anti-mouse IgG (Gamma), HRP-labeled rabbit anti-mouse IgG₁, HRP-labeled rabbit anti-mouse IgG_{2a} は Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA, USA) から購入した。3,3',5,5'-

tetramethylbenzidine (TMB) peroxidase EIA substrate kit は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) から購入した。RPMI1640 培地 (L-グルタミン、HEPES 含有)、2-メルカプトエタノール、ペニシリンーストレプトマイシン、トリパンブルー染色液は GIBCO BRL (Rockville, MD, USA) から購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は旭テクノグラス株式会社 (船橋、千葉) から購入した。Mouse cytokine (IL-4 and IFN- γ) ELISA kits (Cytoscreen™ ELISA kits) は BioSource International, Inc. (Camarillo, CA, USA) から購入した。OVA 含有 PLG MS は第 2 編 - 第 1 章(3) で調製したものをを用いた。破裂膜は第 1 編 - 第 1 章と同様のものをを用いた。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

(2) 実験動物

第 2 編 - 第 1 章(2)と同様の動物を用いた。

(3) 免疫処置法

粒子径 75-100 μm の OVA 含有 PLG MS 1.0 mg を Helios™ gun system にセットし、雌性 BALB/c マウス (10 週齢) の除毛した腹部皮膚にその装置の先端のスペイサー (直径約 25 mm) をあてがい、ヘリウム圧 100、200 又は 300 psi で OVA 含有 PLG MS を噴射した。また、比較として同量の OVA を含有する OVA 生理食塩液 (63 $\mu\text{g}/0.2\text{ ml}$) 及び粒子径 75-100 μm の OVA 含有 PLG MS を 0.1% カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na) 生理食塩液に懸濁させたもの (1.0 mg/0.2 ml) を注射針、注射筒を用いてマウス背部皮下に注射した。Positive control として、Fruend's complete adjuvant を OVA 生理食塩液と 1 : 1 の割合で乳化し背部皮下に注射した (63 $\mu\text{g}/0.2\text{ ml}$)。また、無処置群を設けた。

(4) 血清の採取

免疫処置してから経時的にマウス尾静脈から採血 (0.1 - 0.2 ml) し、室温で 4 時間、4°C で一晩放置した後、4°C、13,600 rpm で 5 分間遠心分離して血清を分離・採取した。ELISA 法で抗体測定するまで得られた血清サンプルを -80°C

で凍結、保存した。

(5) 抗 OVA IgG, IgG₁, IgG_{2a} の測定⁸³⁾

ELISA 法にて血清中の抗 OVA IgG, IgG₁, IgG_{2a} を測定した。OVA を 0.05 M bicarbonate-carbonate 緩衝液 (pH 9.6) に溶解し (10 µg/ml)、この溶液を 96-well の ELISA plate (旭テクノグラス株式会社、船橋、千葉) に加え (100 µl/well)、4°C で一晩コーティングした。その plate を 0.05% Tween 20 を含有する 0.01 M PBS (pH 7.2) (PBST) で 3 回洗浄した後、血清サンプルを PBST で希釈し、各ウェルに 100 µl ずつ添加して室温で一晩インキュベートした。その plate を PBST で 3 回洗浄した後、PBST で 2000 倍に希釈した HPR-labeled goat anti-mouse IgG (Gamma) or HPR-labeled rabbit anti-mouse IgG₁ or HPR-labeled rabbit anti-mouse IgG_{2a} antibody を各ウェルに 100 µl ずつ加えて室温で 2 時間インキュベートした。その plate を PBST で 4 回洗浄した後、TMB peroxidase EIA substrate solution を各ウェルに 100 µl ずつ加えて室温で 20-30 分間インキュベートし、発色させた。次に 1 N 硫酸を各ウェルに 100 µl ずつ加えて発色を停止させた。Multiskan[®] Ascent (Labsystems, Helsinki, Finland) を用いて各ウェルの吸光度を 450 nm で測定した。データは抗体力価として表記し、それは 450 nm での吸光度が 0.25 を示す血清希釈度の逆数と定義した。

(6) Cytokine assay⁸⁴⁾

種々免疫処置後 6 週目にマウス脾臓を摘出、洗浄し、スライドガラスを用いて脾細胞を 10% 非働化 FBS、50 U/ml ペニシリン、50 µg/ml ストレプトマイシン及び 5.5 µM 2-メルカプトエタノールを含有した RPMI1640 培地中に浮遊させた。その浮遊液をナイロンメッシュ (170 メッシュ (100 µm)、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、東京) でろ過した後、静置して結合組織を沈澱、除去した。その後、トリパンブルー染色液及び血球計算盤を用いて 1×10^7 cells/ml の脾細胞浮遊液を調製した。この脾細胞浮遊液を 96-well Multi-well plate (旭テクノグラス株式会社、船橋、千葉) の各ウェルに 100 µl ずつ添加した (1×10^6 cells/well)。各ウェルに種々濃度の OVA を含有した RPMI1640

培地を 100 μ l ずつ添加し、最終的に OVA 濃度を 0、100、500 及び 1000 μ g/ml/well とした。これを 37°C、5% CO₂ で 48 時間培養した後、上清を採取して上清中の IL-4 及び IFN- γ 産生量を Cytoscreen™ immunoassay kit (Mouse IL-4, Mouse IFN- γ) を用いて測定した。測定はその Kit の Protocol booklet の指示に従って行った。

(7) 統計処理

第 1 編—第 4 章(7)と同様の方法で行った。

引用文献

- 1) Y. Kobayashi, H. Nakamura, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, **156**, 153-162 (1997).
- 2) K. Sugibayashi, K. Hosoya, Y. Morimoto and W. I. Higuchi, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 578-580 (1985).
- 3) E. Manabe, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, **129**, 211-221, (1996).
- 4) P. Tyle, *Pharm. Res.*, **3**, 318-326 (1986).
- 5) P. G. Green, R. S. Hinz, C. Cullander, G. Yamane and R. H. Guy, *Pharm. Res.*, **8**, 1113-1120 (1991).
- 6) L. H. Chen and Y. W. Chien, *Drug Develop. Ind. Pharm.*, **20**, 935-945 (1994).
- 7) H. Ueda, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *J. Control. Release*, **37**, 291-297 (1995).
- 8) H. Ueda, M. Ogihara, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1973-1976 (1996).
- 9) J. Asano, F. Suisha, M. Takada, N. Kawasaki and S. Miyazaki, *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 288-291 (1997).
- 10) K. Sugibayashi, M. Kagino, S. Numajiri, N. Inoue, D. Kobayashi, M. Kimura, M. Yamaguchi and Y. Morimoto, *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**, 1179-86 (2000).
- 11) N. Inoue, D. Kobayashi, M. Kimura, M. Toyama, I. Sugawara, S. Itoyama, M. Ogihara, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, **137**, 75-84 (1996).
- 12) J. C. Sanford, T. M. Klein, E. D. Wolf and N. Allen, *Particle Sci. Technol.*, **5**, 27-37 (1987).
- 13) W. C. Lai, M. Bennett, S. A. Johnston, M. A. Barry and S. P. Pakes, *DNA Cell Biol.*, **14**, 643-651 (1995).
- 14) A. L. Gainer, G. S. Korbitt, R. V. Rajotte, G. L. Warnock and J. F. Elliott, *Transplant Proc.*, **27**, 3278 (1995).
- 15) F. Ginot, J. F. Decaux, M. Cognet, T. Berbar, F. Levrat, A. Kahn and A. Weber,

- Eur. J. Biochem.*, **180**, 289-294 (1989).
- 16) H. Luthman and G. Magnusson, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1295-1308 (1983).
 - 17) K. P. Ponder, R. P. Dunbar, D. R. Wilson, G. J. Darlington and S. L. Woo, *Hum. Gene Ther.*, **2**, 41-52, (1991).
 - 18) P. L. Felgner, T. R. Gadek and M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7413-7417 (1987).
 - 19) J. C. Weaver, *Methods Mol. Biol.*, **55**, 3-28, (1995).
 - 20) G. Chu. H. Hayakawa and P. Berg, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 1311-1326 (1987).
 - 21) T. A. Thompson, M. N. Gould, J. K. Burkholder and N. Yang, *In vitro Cell. Dev. Biol.*, **29A**, 165-170 (1993).
 - 22) W. C. Heiser, *Anal. Biochem.*, **217**, 185-196 (1994).
 - 23) W. H. Sun, J. K. Burkholder, J. Sun, J. Culp, J. Turner, X. G. Lu, T. D. Pugh, W. B. Ershler and N. Yang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2889-2893 (1995).
 - 24) D. M. Mahvi, P. M. Sondel, M. R. Albertini, J. H. Schiller, J. Hank, J. Heiner, J. Gan, W. Swain and R. Logrono, *Hum. Gene Ther.*, **8**, 875-891 (1997).
 - 25) Y. Kagawa and J-I Hayashi, *Gene Ther.*, **4**, 6-10 (1997).
 - 26) K. M. Hui and T. F. Chia, *Gene Ther.*, **4**, 762-767 (1997).
 - 27) K. R. Irvine, J. B. Rao, S. A. Rosenberg and N. P. Restifo, *J. Immunol.*, **156**, 238-245 (1996).
 - 28) E. F. Fynan, R. G. Webster, D. H. Fuller, J. R. Haynes, J. C. Santoro and H. L. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11478-11482, (1993).
 - 29) W. C. Lai, M. Bennett, S. A. Johnston, M. A. Barry and S. P. Pakes, *DNA Cell Biol.*, **14**, 643-651 (1995).
 - 30) P. Degano, D. F. Sarphe and C. R. M. Bangham, *Vaccine*, **16**, 394-398 (1998).
 - 31) M. D. Macklin, D. McCabe, M. W. McGregor, V. Neumann, T. Meyer, R. Callan, V. S. Hinshaw and W. F. Swain, *J. Virol.*, **72**, 1491-1496 (1998).
 - 32) L. Vanderzanden, M. Bray, D. Fuller, T. Roberts, D. Custer, K. Spik, P. Jahrling, J. Huggins, A. Schmaljohn and C. Schmaljohn, *Virology*, **246**, 134-144 (1998).

- 33) M. F. Powell and M. J. Newman, (ed.) "Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach" Pharmaceutical Biotechnology Vol. 6 Plenum Publishing Corporation, New York, 1995.
- 34) J. H. Eldridge, J. K. Staas, J. A. Meulbroek, J. R. McGhee, T. R. Tice and R. M. Gilley, *Mol. Immunol.* **28**: 287-294 (1991). —
- 35) B. Gander, H. P. Merkle and G. Corradin (ed.), "Antigen Delivery Systems" Immunological and Technological Issue, Drug Targetting and delivery, harwood academic publishers, Netherlands, 1997.
- 36) D. T. O'Hagan, H. Jeffery and S. S. Davis, *Vaccine*, **11**, 965-969 (1993).
- 37) M. Singh, X-M. Li, H. Wang, J. P. McGee, T. Zamb, W. Koff, C. Y. Wang and D. T. O'Hagan, *Infect. Immun.*, **65**, 1716-1721 (1997).
- 38) M. Singh, X-M. Li, J. P. McGee, T. Zamb, W. Koff, C. Y. Wang and D. T. O'Hagan, *Vaccine*, **15**, 475-481 (1997).
- 39) J. D. Bos (ed.), "Skin Immune System (SIS)" second edition, CRC Press, Boca Raton, New York, 1997.
- 40) J. D. Bos and M. L. Kapsenberg, *Immunol. Today*, **7**, 235-240 (1986).
- 41) 稲葉カヨ、瀧川雅浩編集、樹状細胞—基礎から臨床へ、南江堂、2000.
- 42) L. Vanderzanden, M. Bray, D. Fuller, T. Roberts, D. Custer, K. Spik, P. Jahrling, J. Huggins, A. Schmaljohn and C. Schmaljohn, *Virology*, **246**, 134-144 (1998).
- 43) D. Chen, C. A. Erickson, R. L. Endres, S. B. Periwal, Q. Chu, C. Shu, Y-F. Maa and L. G. Payne, *Vaccine*, **19**, 2908-2917 (2001).
- 44) B. J. Bellhouse, D.F. Sarphe and J. C. Greenford, Intl. Patent Applic., WO 94 / 24263, 27 October 1994.
- 45) T. L. Burkoth, B. J. Bellhouse, G. Hewson, D. J. Longridge, A. G. Muddle and D. F. Sarphe, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **16**, 331-384 (1999).
- 46) M. Raffel, C. E. Willert, J. Kompenhans, "Particle Image Velocimetry", Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1998.
- 47) D. F. Sarphe, B. Johnson, M. Cormier, T. L. Burkoth, B. J. Bellhouse, *J. Control. Release*, **47**, 61-69 (1997).

- 48) M. Uchida, Y. Jin, H. Natsume, D. Kobayashi, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *J. Pharm. Pharmacol.*, (Accepted).
- 49) M. C. Gohel, M. M. Patel, J. S. Kaul, R.B. Patel, S. R. Patel and T. R. Jani, *Drug Develop. Ind. Pharm.*, **22**, 637-643 (1996).
- 50) Y. Jin, M. Uchida, C. Wang, H. Natsume, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Acta Pharmaceutica Sinica*, **36**, 140-144 (2001).
- 51) J. H. Draize, G. Woodard and H. O. Calvery, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**, 377-390 (1944).
- 52) B. Ballantyne, R. C. Myers and D. L. Blaszcak, *Vet. Hum. Toxicol.*, **39**, 340-346 (1997).
- 53) M. Uchida, H. Natsume, D. Kobayashi, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Biol. Pharm. Bull.*, (Accepted).
- 54) Y. Yoshida, E. Kobayashi, H. Endo, T. Hamamoto, T. Yamanaka, A. Fujimura and Y. Kagawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 695-700 (1997).
- 55) I. Grant, *Proc. Inst. Mech. Eng.*, **211**, 55-76 (1997).
- 56) C. Willert and M. Gharib, *J. Fluid Mech.*, **345**, 227-250 (1997).
- 57) 矢田純一著、医系免疫学、中外医学社 1999.
- 58) E. Mayfield, *FDA Consum.*, **27**, 9-13 (1993).
- 59) Reducing the risk of unsafe injections in immunization programmes: The role of injection equipment. World Health Organization Expanded Programme on Immunization., WHO, Geneva, Switzerland, 1996.
- 60) A. M. Polillio and J. Kiley, *Pediatr. Nurs.*, **23**, 46-49 (1997).
- 61) J. P. McGee, M. Singh, X.-M. Li, H. Qiu and D. T. O'Hagan, *J. Microencapsul.*, **14**, 197-210 (1997).
- 62) T. Uchida, K. Yoshida, A. Ninomiya and S. Goto, *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1569-1573 (1995).
- 63) T. S. Kim, R. H. DeKruyff, R. Rupper, H. T. Maecker, S. Levy and D. T. Umetsu, *J. Immunol.*, **158**, 4137-4144 (1997).
- 64) R. Bomford, *Clin. Exp. Immunol.*, **39**, 435-441 (1980).

- 65) S. Kodihalli, V. Sivanandan, K. V. Nagaraja, D. Shaw and D. A. Halvorson, *Vaccine*, **12**, 1467-1472 (1994).
- 66) V. A. Slepushkin, J. M. Katz, R. A. Black, W. C. Gamble, P. A. Rota and N. J. Cox, *Vaccine*, **13**, 1399-1402 (1995).
- 67) Y. Xiano, Y. Lu and Y. H. Chen, *Immunol. Lett.*, **77**, 3-6 (2001).
- 68) J. Meng, X. Dai, J. C. Chang, E. Lopareva, J. Pillot, H. A. Fields and Y. E. Khudyakov, *Virology*, **288**, 203-211 (2001).
- 69) E. F. Fyann, R. G. Webster, D. H. Fuller, J. R. Haynes, J. C. Santoro and H. L. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11478-11482 (1993).
- 70) A. M. Watts and R. C. Kennedy, *Int. J. Parasitol.*, **29**, 1149-1163 (1999).
- 71) K. Cichutek, *Intervirology.*, **43**, 331-338 (2000).
- 72) R. Schirmbeck, K. Melber, T. Mertens and J. Reimann, *J. Virol.*, **68**, 1418-1425 (1994).
- 73) F. D. Finkelman, K. B. Madden, A. W. Cheever, I. M. Katona, S. C. Morris, M. K. Gately, B. R. Hubbard, W. C. Gause and J. F. Urban Jr, *J. Exp. Med.*, **179**, 1563-1572 (1994).
- 74) E. Pearlman, W. K. Kroeze, F. E. Hazlett, S. A. Chen, S. D. Mawhorter, W. H. Boom and J. W. Kazura, *Exp. Parasitol.*, **76**, 200-208 (1993).
- 75) A. Keane-Myers and S. P. Mickell, *J. Immunol.*, **155**, 2020-2028 (1995).
- 76) P. Scott, E. Pearce, A. W. Cheever, R. L. Coffman and A. Sher, *Immunol. Rev.*, **112**, 161-182 (1989).
- 77) M. Clerici and G. M. Shearer, *Immunol. Today*, **14**, 107-111 (1993).
- 78) T. R. Mosmann, *Sciences*, **265**, 193-194 (1994).
- 79) T. Boon, *Sci. Am.*, **268**, 82-89 (1993).
- 80) G. J. V. Nossal, *Sci. Am.*, **269**; 52-62 (1993).
- 81) D. Chen, K. F. Weis, Q. Chu, C. A. Erickson, R. L. Endres, C. R. Lively, J. Osorio and L. G. Payne, *J. Virol.*, **75**, 11630-11640 (2001).
- 82) D. Chen, S. B. Periwal, K. Larrivee, C. Zuleger, C. A. Erickson, R. L. Endres and L. G. Payne, *J. Virol.*, **75**, 7956-7965 (2001).

83) E. C. Lavelle, P. G. Jenkins and J. E. Harris, *Vaccine*, **15**, 1070-1078 (1997).

84) K. D. Newman, J. Samuel and G. Kwon, *J. Control. Release*, **54**, 49-59 (1998).

